

Taina Savolainen

Yleisimpien bakteeriviljelyssä käytettävien elatusaineiden valmistaminen

Perehdytysmateriaali HUSLABin bakteriologian yksikköön

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyöraportti

17.4.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Taina Savolainen Yleisimpien bakteeriviljelyssä käytettävien elatusaineiden valmistaminen 29 sivua + 2 liitettä 17.04.2018
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Reetta Sihvonen Sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavainen
<p>Elatusaineet ovat osa klinisen mikrobiologian analytiikkaa. Elatusaineita käytetään bakteerien kasvatukseen kliinisessä diagnostiikassa. Elatusaineita valmistetaan erilaisiin käyttötarkoituksiin ja eri elatusaineilla on erilaiset toimintaperiaatteet. Elatusaineilla mahdollistetaan tutkittavien bakteerien kasvu ja toisaalta voidaan myös estää analyysiä häiritsevien bakteerien kasvua.</p> <p>Opinnäytetyössä esitellään HUSLAB:in elatusaineyksikön maljanvalmistusprosessi. Työssä käydään läpi yleisimmät bakteerien viljelyssä käytettävät maljat, niiden toimintaperiaate sekä elatusaineiden laaduntarkkailu. Raporttia voidaan käyttää uusien työntekijöiden ja opiskelijoiden oppimisen tukena sekä vanhojen työntekijöiden osaamisen tukena.</p> <p>Opinnäytetyössä menetelmänä käytettiin toiminnallista menetelmää, joka sisälsi prosessin seuraamisen HUSLABin elatusaineyksikössä sekä työn kirjallisen dokumentoinnin.</p> <p>Opinnäytetyössä luotiin perehdytysmateriaali, joka tulee osastolle yleiseen käyttöön.</p>	
Avainsanat	Elatusaine, elatusalusta, viljelymalja, viljelyalusta, agar

Author Title	Taina Savolainen Manufacture of most common bacterial culture medium
Number of Pages Date	29 pages + 2 appendices 17 April 2018
Degree	Health care and Social Services
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Vesa Kirjavainen, Hospital Microbiologist Reetta Sihvonen, Senior lecturer
<p>The culture mediums are part of the analysis of clinical microbiology. The mediums are used to the clinical diagnostic of the bacterial. Various mediums have a different mechanism of action that allows the growth of certain bacterial strains and prevent the growth of bacterial strains that disrupting analysis.</p> <p>This project was performed at the Hospital district of Helsinki in the department of microbiology, HUSLAB laboratories. The purpose of the project was to demonstrate most common agar plates of HUSLAB, and their working principle and quality inspection. The report may be used to support new employees and students, and to support the knowledge of employees.</p> <p>Functional methods are used in the thesis, including monitoring of the media preparation process in the HUSLAB and reporting of that process. The result of the process became orientation material for HUSLAB.</p> <p>The orientation material becomes available to the HUSLAB's employees.</p>	
Keywords	Medium, culture dish, culture medium, agar

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyöprosessi ja sen tavoite	2
3	Elatusaineiden valmistus	2
3.1	Elatusainealusta bakteerien kasvun mahdollistaja ja estäjä	3
3.2	Elatusainealustojen valmistaminen	4
3.3	Maljojen merkitseminen	7
4	Työssä tarkasteltavat elatusaineet	8
4.1	Kromogeeniset elatusaineet	9
4.1.1	ESBL-malja	10
4.1.2	MRSA-malja	11
4.1.3	Ori-malja	12
4.1.4	SCarba-malja	12
4.1.5	SAM-malja	13
4.1.6	VRE-malja	14
4.2	Herkkyysmaljat	14
4.2.1	Mueller Hinton eli MH-malja	15
4.2.2	Mueller Hinton Fastidious eli MH-F-malja	16
4.3	Verta ja/tai antibioottia sisältävät elatusaineet	16
4.3.1	Kolistiini-oksoliinihappo-malja eli CO-malja	18
4.3.2	Fastidious Anaerobe agar eli FAA-malja	19
4.3.3	Suklaamalja	20
4.3.4	Thayer Martin 5 eli TM5-malja	21
4.3.5	Verimalja	21
4.3.6	Neomysiini-vankomysiini-malja eli NV-malja	22
4.4	Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar eli CLED-malja	23
4.5	Tioglykolaatti-putki eli Tio-putki	24
5	Steriiliyden ja toiminnan kontrollointi	25
6	Opinnäytetyön arviointi, pohdinta ja eettisyys	27
6.1	Työn eettinen näkökulma	28
	Lähteet	30

Liitteet

Liite 1. Maljojen toimintakontrolli taulukko

Liite 2. Kuvia maljojen toimintakontrolleista

1 Johdanto

Elatusaineet ovat olennainen osa bakteerien aiheuttamien sairauksien tutkimista eli niiden laadukas valmistaminen ja toiminnan kontrollointi ovat avainasemassa luotettavien tulosten takaamiseksi. Elatusaineet ovat bakteriologian laboratoriossa arkipäiväinen työväline ja elatusaineet täytyykin valmistaa tietyllä tavalla, jotta lopputulos vastaa haluttua. Maljavalmistuksessa huomioidaan esimerkiksi eri bakteerien kasvuolosuhdevaatimukset sekä metabolia. Elatusaineet suunnitellaan niin, että kliinisesti merkittävät bakteerit saadaan kasvamaan ja diagnoosia häiritsevien bakteerien kasvu estetään eri mekanismeilla.

Opinnäytetyössä perehdyttiin kirjallisuudessa esiintyvien elatusaineiden valmistamiseen ja laadunvarmistukseen. Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää HUSLAB:n yleisimpien bakteeriviljelyssä käytettävien elatusainealustojen valmistusprosessi, toimintaperiaatteet sekä laadunvarmistus.

Työ toteutettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun opinnäytetyönä HUSLAB:n bakteriologian osastolle. Aihe ja yhteistyö bakteriologian osaston kanssa juonsivat juurensa omasta työhistoriastani HUSLAB:n elatusaineosastolla. Työhistoriani perusteella tiesin maljanvalmistusprosessin perusasiat, mutta halusin syventää tietojani asiasta. Lisäksi ollessani töissä HUSLAB:n elatusaineosastolla havaitsin, että tarve laajemmalle perehdytysmateriaalille on olemassa. Osastonhoitajan kanssa käymieni keskustelujen perusteella todettiin, että olisi hyvä, mikäli työntekijöillä olisi tarkempaa tietoa maljojen toiminnasta ja käytöstä: tällöin työnteko muuttuu mielekkäämmäksi ja mahdollisten virheiden määrä pienenee.

Opinnäytetyöstä rakennettiin olemassa olevien ohjeiden ja kirjallisen tiedon pohjalta kirjallinen perehdytysmateriaali elatusaineyksikön uusille ja nykyisille työntekijöille. Luodun perehdytysmateriaalin tarkoituksena on lisätä työntekijöiden tietoisuutta maljojen valmistamisesta ja nostaa esille myös niitä maljavalmistukseen liittyviä asioita, jotka ovat merkityksellisiä laadukkaan lopputuloksen kannalta.

2 Opinnäytetyöprosessi ja sen tavoite

Opinnäytetyön tavoitteena oli luoda HUSLAB:n bakteriologian osastolle yleisimpiä bakteeriviljelyssä käytettäviä elatusaineita koskeva perehdytysmateriaali laboratoriohoitajia/bioanalytikoita varten. Opinnäytetyö oli toiminnallinen projekti, joka sisälsi kirjallisen raportin kirjoittamisen. Raportti toimii samalla myös perehdytysmateriaalina yhdessä Power Point esityksen kanssa. Työssä keskityttiin kattavan perehdytysmateriaalin valmistamiseen työpaikan tarpeet huomioiden.

Työssä kartoitettiin nykyisen ohjeistuksen sisältöä ja vertailtiin niitä kirjallisuuslähteisiin. Työssä myös perehdyttiin tarkemmin eri elatusaineiden valmistamisen vaatimuksiin maljojen ominaisuuksien näkökulmasta. Kerätty tieto koostettiin kirjalliseksi raportiksi, joka sisältää elatusainevalmistukseen liittyvän teoreettisen tiedon. Raportista luotiin selkeä käsikirja, jolla voidaan lisätä työntekijöiden teoretista tietoutta ja lisätä näin työn laatua ja mielekkyyttä. Kirjallinen materiaali sisältää ohjeistuksen maljojen valmistamiseen sekä selittää, mitä eri maljoja valmistettaessa tulee ottaa huomioon, ja mikä on niiden toimintamekanismi sekä miten niiden toimivuutta ja laatua kontrolloidaan.

Raportin tarkoituksena on toimia tukimateriaalina, jota voidaan käyttää esimerkiksi perehdytettäessä uusia työntekijöitä maljojen valmistukseen tai lisäämään opiskelijoiden tietoja maljavalmistuksesta sekä maljojen toimintamenetelmistä. Lisäksi raporttia voidaan myös käyttää nykyisten työntekijöiden osaamisen ylläpitämisessä.

3 Elatusaineiden valmistus

Elatusaineet ovat olennainen osa mikrobiologisen laboratorion toimintaa. Elatusaineiden tulee olla laadukkaita, sillä tulosten luotettavuus on sidoksissa käytössä olevien elatusaineiden laatuun. Valmistusprosesseissa käytettävien laitteiden toimintaa sekä reagenssien ja ionivaihdetun veden laatua tulee seurata. Valmistuksen aikana tulee myös varmistaa tuotteen oikea pH, ulkonäkö ja paksuus. Maljan pH vaikuttaa bakteerien kasvuun, sillä bakteerit eivät kasva liian happamassa tai emäksisessä ympäristössä. Valmiiden tuotteiden laatua varmistetaan steriiliys- ja toimivuuskontrolleilla. Laadu-

kas elatusaine on puhdas, eikä sisällä ympäristöstä tullutta kontaminaatiota. Laadukkaalla maljalla bakteerit kasvavat hyvin, mutta se estää kuitenkin joidenkin bakteerien kasvua. (Ehder 2006.)

Elatusaineet voidaan jakaa erilasiin ryhmiin niiden ominaisuuksien perusteella. Osa elatusaineista voi kuulua yhtä aikaa useampaan ryhmään. Jotkin elatusaineet sisältävät aineita, mitkä mahdollistavat tiettyjen bakteerien kasvamisen aineenvaihdunta reaktioihin perustuen. Näihin kuuluvat muun muassa erilaisista hiilihydraateista ja muista hiilenlähteistä hapon tuottaminen tai dekarboksylaatio aminohapoista. Jotkin elatusaineet sisältävät indikaattoreita, jotka mahdollistavat tällaisten aineenvaihdunta reaktioiden visuaalisen havaitsemisen pH-arvon muutosten avulla. Useat elatusaineet sisältävät myös kromogeenisiä väriaineita, jotka vaihtavat väriä bakteereissa tapahtuvien entsymaattisten reaktioiden seurauksena. (Atlas – Snyder 2015: 324–325.)

3.1 Elatusainealusta bakteerien kasvun mahdollistaja ja estäjä

Eri bakteerilajeilla on erilaisia kasvuun vaikuttavia tekijöitä. Näitä ovat esimerkiksi lämpötila, hapen määrä ja ympäristön pH. Ihmisessä tauteja aiheuttavat bakteerit lisääntyvät yleensä parhaiten 37 °C:ssa ja ne ovat myös herkkiä kasvulämpötilan vaihteluille: jo muutaman asteen muutos optimaalisesta lämpötilasta voi johtaa bakteerin kasvun estymiseen, hidastumiseen tai pysähtymiseen. (Niemelä 2002: 193.) Bakteereilla on myös erilaisia ominaisuuksia tarvittavan hapen määrän mukaan. Jotkin bakteerit eivät siedä lainkaan happea, jotkin taas sietävät, mutta eivät välttämättä tarvitse, ja jotkin tarvitsevat happea elääkseen. (Salkinoja-Salonen 2002: 196–198.) Lisäksi jokaisella bakteerilla on jokin tietty pH-alue, jossa se kasvaa parhaiten. Luonnossa elävillä bakteereilla se on yleensä 5:n ja 9:n välillä, ja jos ympäristö muuttuu liian happamaksi tai emäksiseksi bakteerin elinkyky heikkenee. Suurin osa bakteereista vaatii kuitenkin lähes neutraalin tai lievästi emäksisen kasvualustan kasvaakseen. (Sojakka – Välimäki 2011: 124–126.)

Maljoja valmistetaan käyttöaiheen mukaan, jolloin ne sisältävät erilaisia bakteerien kasvua edistäviä tekijöitä, kuten liha- tai hiivauutteita sekä proteiineja. Elatusainetta voidaan myös rikastaa verellä, mikä auttaa esimerkiksi hemolyyttisten bakteerien tunnistamisessa. Verta voidaan lisätä elatusaineseokseen myös niin, että se kuumennetaan, jolloin veren rakenne rikkoutuu ja se muuttuu ruskeaksi: saadaan aikaiseksi niin kutsuttu suklaamalja. Suklaamaljoissa veren sisältämät ravintoaineet ovat vapautuneet

paremmin bakteerien käyttöön ja malja on ravinnerikas yleismalja, jolla voivat kasvaa myös vaativat bakteerit. Elatusaineista voidaan tehdä myös erottelevia lisäämällä niihin aineita, jotka helpottavat bakteerien alustavaa tunnistamista tai selektiivisiä eli valikoivia sen suhteen, mitkä bakteerit elatusaineella saadaan kasvamaan. Diagnostisesti merkityksettömien bakteerien kasvamista voidaan estää antibiooteilla ja muilla antibakteerisilla aineilla. Elatusaineita valmistettaessa voidaan tehdä ominaisuuksiltaan myös sellaisia elatusaineita, jotka sisältävät sekä valikoivan että erottelevan maljan ominaisuuksia. (Carlson – Koskela 2011: 41–42.)

Elatusaineita voidaan valmistaa myös sen mukaan tarvitsevatko tai sietävätkö tutkittavat bakteerit happea vai eivät. Bakteereita, jotka sietävät tai tarvitsevat happea, viljellään aerobisissa olosuhteissa. Ilman happea aerobiset bakteerit eivät voi kasvaa, vaan kuolevat, koska ne tarvitsevat happea energiantuotantoon. Anaerobiviljelyä käytetään puolestaan sellaisten bakteerien viljelemiseen, jotka eivät siedä happea. Anaerobisille bakteereille happi on vahingollista ja ne saavatkin energiansa muun muassa käymisreaktiosta. Koska kiinteällä elatusaineella bakteerien hapensaanti on esteetön, anaerobisia bakteereita viljeltäessä kiinteällä alustalla voidaan malja laittaa säiliöön tai pussiin, josta happi poistetaan happea sitovalla aineella: näin saadaan aikaan olosuhteet, joissa anaerobiset bakteerit pystyvät kasvamaan. Aerobisten bakteerien kasvattaminen nestemäisissä elatusaineissa on vaikeaa, sillä happi sitoutuu huonosti nesteeseen ja bakteerit käyttävät nesteen ennestään sisältämän hapen nopeasti, jolloin bakteerin kasvu pysähtyy. (Salkinoja-Salonen 2002: 196–197.)

3.2 Elatusainealustojen valmistaminen

Elatusaineilla pyritään luomaan mahdollisimman optimaaliset olosuhteet bakteerien kasvuille, jolloin niitä on helpompi tutkia. Laboratorio historian ensimmäiset viljelymaljat oli hyödytetty liivateella, mutta siitä on luovuttu merilevästä peräisin olevan agarin tultua tilalle. Liivatteen käyttö on pääasiassa vähentynyt siksi, että monet bakteerit pystyvät hajottamaan liivatetta sekä toisaalta myös sen takia, että hyyttymiseen tarvitaan suhteellisen suuri määrä liivatetta. (Sojakka – Välimäki 2011: 18–19.)

Kiinteitä elatusaineita valmistetaan valamalla nestemäinen agarisa sisältävä liuos petri-maljalle, johon se hyttyy kiinteäksi (Carlson – Koskela 2011: 41). Käytettävä agar on merilevästä eristetty polysakkaridi, joka liukenee veteen, kun sen lämpötila ylittää 95 °C. Agar pysyy nestemäisenä noin 45 °C:een asti. Nestemäinen elatusaineseos, joka

sisältää agaria steriloidaan aineiden liuottamisen jälkeen. (Salkinoja-Salonen 2002: 57–62.) Maljat jaellaan, kun agar on noin 45–50 °C (Atlas – Snyder 2015: 324). Elatusaineet steriloidaan autoklavaimalla. Autoklavoinnin tarkoitus on tuhota elatusaineen sisältämät elinkykyiset mikrobit, jotta siinä ei ilmene ylimääräistä ulkopuolista mikrobikasvua. (Laitinen – Ratia 2011: 317.)

Maljojen valmistus aloitetaan punnitsemalla tarvittavat reagenssit. Elatusaineet valmistetaan ionivaihdettuun veteen. Sterilointi suoritetaan erlenmayerkolvissa autoklaavissa tai elatusainekeittimen (kuvio 1, kuvio 2) kattilassa. Sterilointiaika ja -lämpötila vaihtelevat käytettävän elatusainepohjan mukaan, aika voi olla 4 minuutista 15 minuuttiin ja lämpötila 100–121 °C. Sterilointiaika ja -lämpötila selviävät työohjeista sekä valmistajan tuoteohjeesta. Sterilointiaika alkaa, kun tuote on saavuttanut sterilointilämpötilan. (Sajakka – Välimäki 2011: 20–22.) Esimerkiksi hiilihydraatteja sisältäviä kasvualustoja steriloidaan usein 116 tai 118 asteessa, jotta hiilihydraatit eivät hajoa ja muodosta myrkyllisiä yhdisteitä, jotka estäisivät bakteerien kasvua. Elatusaineen asianmukainen valmistaminen on kriittistä sen toimivuuden kannalta. (Atlas – Snyder 2015:324–325.)

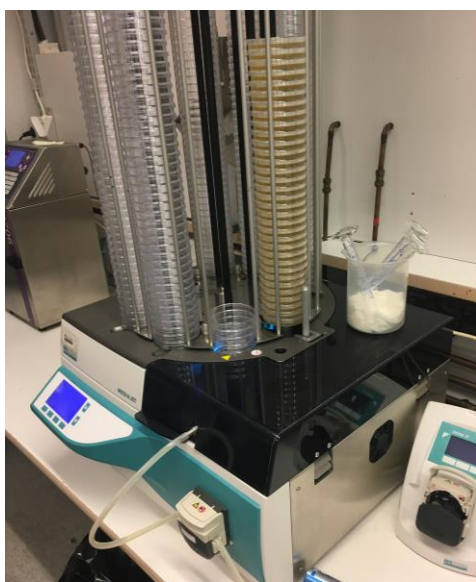


Kuvio 1: Elatusainekeitin



Kuvio 2: Elatusaineen lisääminen keittimeen

HUSLAB:ssa maljat jaellaan Mediajet-elatusaineannostelijoilla (Mediq) (kuvio 3), joihin on yhdistetty Mediajet-veripumppu (Mediq), joka mahdollistaa veren lisäämisen maljaan jakeluvaiheessa. HUSLAB:ssa yhdelle maljalle jaellaan 20 ml elatusainetta, lukuun ottamatta herkkyyshaljoja, joiden kohdalla jaeltava määrä on 25 ml elatusainetta maljaa kohden. Maljalle annosteltavan elatusaineen määrä tarkistetaan mittalasilla ennen jakelua sekä sadan jaellun maljan jälkeen. Määrää säädetään tarvittaessa. Valmiita maljoja jäädytetään pöydällä 2–3 tuntia ennen pakkaamista. (Iivonen 2018.) Maljat jäädytetään tasaisella alustalla. Agarin hyytyessä maljan kanteen tiivistyy vesihöyryä. Mitä kuumempaa agar on valun aikana, sitä enemmän höyryä muodostuu. Kun maljojen annetaan hyytyä hitaasti pinoissa, höyrystynyt vesi imeytyy takaisin maljaan. (Salonen-Salonen 2002:63.)



Kuvio 3: Elatusaineannostelija

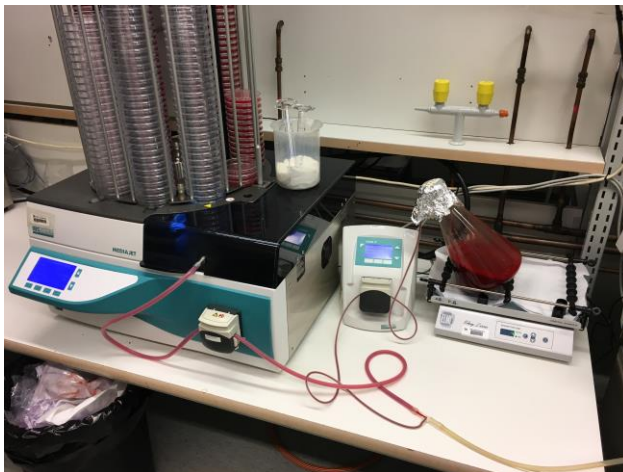
Veri voidaan lisätä maljapohjaan steriloinnin jälkeen (lämpötilassa 75 °C), kun käytetään elatusainekeittimen suklaa-ohjelmaa. Tällöin keittimen näytölle ilmestyy teksti: Lisää veri. Veri lisätään keittimeen aseptisesti suppilon avulla lisäainekorkista (kuvio 4). Veren lisäyksen jälkeen ohjelmaa jatketaan, jolloin keitin pitää seoksen 2 minuuttia 75 °C:ssa. (Iivonen 2016a.) Verilisäys voidaan tehdä niin sanotusti tuoreena Mediajet veripumpun avulla (kuvio 6), jolloin käytetään erillistä jakeluletkua (Iivonen 2018). Lisäämällä veri tuoreena elatusaineeseen siihen saadaan ehjiä punasoluja, joiden avulla pystytään havaitsemaan bakteerin hemolyyysin aiheuttamiskyky. Lisäaineet ja antibiootit lisätään yleensä ohjelman päätyttyä lisäaineportista (kuvio 5) aseptisesti liekkiä käyttäen, lukuun ottamatta niitä tilanteita, joissa käytettävä lisäaine on tulenarkaa. Kaikki lisäaineet eivät kestä korkeita lämpötiloja vaan hajoavat steriloinnin aikana.



Kuvio 4: Verin lisääminen lisäaineportista



Kuvio 5: Lisäaineen lisääminen lisäaineportista



Kuvio 6: Verin lisääminen veripumpulla

3.3 Maljojen merkitseminen

Maljojen merkitseminen on tärkeää, jotta tiedetään, mikä malja on kyseessä, ja että se ei ole käyttöönotettaessa vanhentunut. Maljat merkitään automaattisella mustesuihkutulostimella jakelun yhteydessä. Leimassa näkyy lyhenne maljan nimestä, valmistuspäivä sekä viimeinen käyttöpäivä. Suurin osa maljoista jaellaan kirkkaille petrimaljoille, mutta jotkin elatusaineet jaellaan värillisille maljoille helpottamaan maljan tunnistamista. Taulukossa 1 on esitetty kunkin maljan leima, kuoren väri ja varamerkintä. Mikäli maljaa ei voida merkitä normaalilla menetelmällä käytetään silloin varamerkintäjärjes-

telmää. Varajärjestelmässä käytetään maljakohtaista leveää tussiraitaa, joka kertoo, mikä malja on kyseessä. Esimerkiksi 1xvihreä tarkoittaa yhtä vihreää leveää raitaa, joka on CO-maljan varamerkintä. Lisäksi käytetään valmistusviikon ja valmistuserän kertovaa kapeaa tussiraitaa eli viikkoviivaa, joka on kuukauden jokaisella viikolla erivärinen. Jotkin maljat merkitään pelkästään viikkoviivalla, mutta nämä maljat voidaan erottaa toisistaan ulkonäön tai maljan kuoren värin perusteella. Jotkin maljat merkitään varamerkintäjärjestelmässä tarralla, josta käy ilmi maljan nimi, valmistuspäivä ja viimeinen käyttöpäivä.

Taulukko 1. Maljojen merkintä ja varamerkintä

Malja	Merkintä	Kuoren väri	Varamerkintä
ESBL	ESBL	kirkas	tarra: ESBL
MRSA	MRSA	kirkas	tarra: MRSA
Ori	ORI	kirkas	1xmusta + viikkoviiva
SCarba	SCARBA	vihreä	viikkoviiva
SAM	SAM	keltainen	viikkoviiva
VRE	VRE	kirkas	tarra: VRE
Mueller Hinton	MH	kirkas	viikkoviiva
Mueller Hinton Fastidious	MH-F	sininen	1xvihreä + 1xmusta + viikkoviiva
Kolистиini-oksoliinihappo	CO	kirkas	1xvihreä + viikkoviiva
Fastidious Anaerobe	FAA	kirkas	1xmusta + viikkoviiva
Suklaa	SUKLAA	kirkas	viikkoviiva
Thayer Martin 5	TM5	vihreä	1xpunainen + viikkoviiva
Veri	VERI	kirkas	viikkoviiva
NV	NV	sininen	viikkoviiva
CLED	CLED	kirkas	viikkoviiva
Tio-putki	Tarra: TIO tai viikkoviiva		

4 Työssä tarkasteltavat elatusaineet

HUSLAB:n elatusaineyksikössä on ohjeita noin 60 erilaiselle elatusaineelle. Elatusainneiden runsaan määrän vuoksi työssä käsiteltävien elatusaineiden määrää rajattiin. Työhön valittiin tärkeimmät märkänäyteviljelyissä käytettävät elatusaineet, muutama

moniresistenttien bakteerien diagnostiikassa käytettävä elatusaine sekä bakteerien rikastukseen käytettävä Tio-putki. Käsiteltävien elatusaineiden rajaus tehtiin yhteistyössä sairaalamikrobiologi Vesa Kirjavaisen kanssa. Opinnäytetyössä tarkasteltavat elatusaineet on esitelty taulukossa 2.

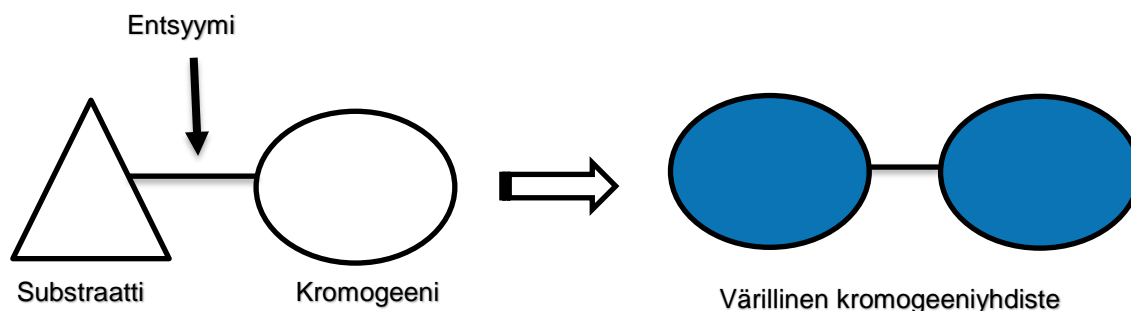
Taulukko 2. Työhön valitut elatusaineet ja työssä käytettävä lyhenne sekä käyttötarkoitus

Elatusaine	Lyhenne	Käyttötarkoitus
ESBL	ESBL	ESBL-viljely
MRSA	MRSA	MRSA-viljely
ORI	ORI	<i>E. coli</i> tunnistus, virtsojen hajotusviljely
SCarba	SCarba	CPE bakteereiden etsintä
SAM	SAM	<i>Staph. aureus</i> tunnistus
VRE	VRE	VRE-viljely
Mueller Hinton	MH	Herkkyyismäärittäjä
Mueller Hinton Fastidious	MH-F	Herkkyyismäärittäjä vaativille bakteereille
Kolistiini-oksoliinihappo	CO	Selektiivinen streptokokkimalja
Fastidious Anaerobe	FAA	Anaerobibakteereiden yleismalja
Suklaa	Suklaa	Ravinnerikas yleismalja
Thayer Martin 5	TM5	GC-viljely, myös meningokokille
Veri	VERI	Yleismalja hemolyysin osoitukseen
NV	NV	Anaerobisten gram neg sauvojen viljelyyn
CLED	CLED	Virtsaviljely, erotteleva yleismalja
Tio-putki	TIO	Yleisrikastusliemi

4.1 Kromogeeniset elatusaineet

Kromogeeniset elatusaineet valmistetaan samaan tapaan kuin muutkin elatusaineet, mutta niihin lisättävät lisäaineet eli suplementit ovat valmistajien omia. Suplementti tulee kuivattuna ja se liuotetaan steriiliin ionivaihdettuun veteen tai alkoholiin ennen elatusaineeseen lisäämistä. Kromogeeniset elatusaineet tulee säilyttää valolta suojattuna, koska todennäköisesti niiden sisältämät väriaineet joko hajoavat tai muuttuvat bakteereille myrkyllisiksi valon vaikutuksesta. (Rose Bengal Chloramphenicol Agar. 2018).

Kromogeenisillä elatusaineilla on kaikilla samanlainen toimintaperiaate (kuvio 7). Ne perustuvat elatusaineen sisältämiin väriaineisiin eli kromogeeneihin. Kun kromogeeni on yhdistetty substraattiin, se on väritön. Kun tutkittavan bakteerin kromogeenille spesifi entsyymi katkaisee entsyymi-substraattireaktiossa värittömän kromogeenisubstraattiyhdisteen, kromogeeni vapautuu ja värjää pesäkkeen. (CHROMagar. 2009.)



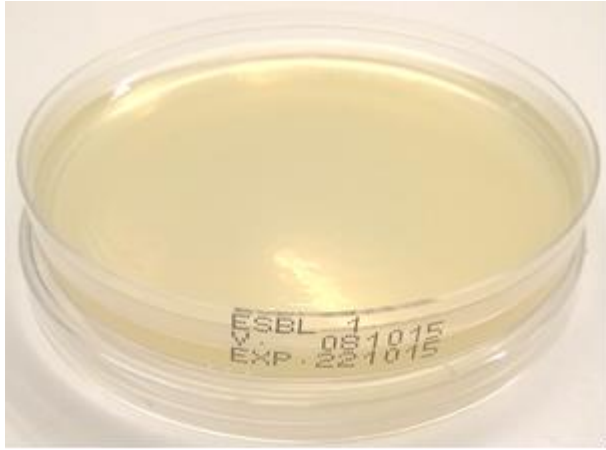
Kuvio 7: Entsyymi spesifinen substraattikromogeeni-yhdiste hajoaa entsyymin vaikutuksesta, jolloin kromogeeni sitoutuu toiseen kromogeeniin ja muodostaa värillisen yhdisteen (Chromogenic Technology. 2009.)

Kromogeenisiin elatusaineisiin voidaan myös lisätä antimikrobisia aineita, jolloin niistä saadaan valikoivia sen suhteen, mitkä bakteerit niillä kasvavat. Tarkkoja tietoja elatusaineiden sisältämisestä aineista ei ole saatavilla valmistajilta, koska tiedot salataan liikesalaisuuden nojalla. (Kärpänoja 2007.)

Tässä työssä käsiteltävät kromogeeniset maljat ovat ESBL-, MRSA-, Ori-, SCarba-, SAM-, ja VRE-maljat.

4.1.1 ESBL-malja

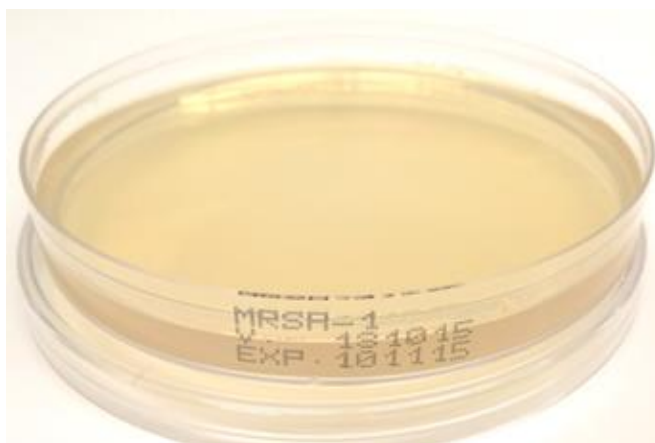
ESBL-maljaa (kuvio 8) käytetään moniresistenttien bakteereiden tunnistamisessa. Maljan pohjana on CHROMagar™ Orientation ja lisäaineena ESBL-supplementti. Supplementin avulla yleisravintoagarpohjasta saadaan malja ESBL-bakteerien havaitsemiseen ja *Escherichia coli*n, *Klebsiellan* ja *Pseudomonaksen* erottamiseen toisistaan. Maljapohja valmistetaan liuottamalla CHROMagar™ Orientation jauhetta ionivaihdettuun veteen. Seoksen annetaan sekoittua huolellisesti ennen autoklavointia. Seosta autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen se jäähdytetään jakelulämpötilaan. Jäähdyttämisen jälkeen seokseen lisätään ESBL-supplementti ja annetaan seoksen sekoittua huolellisesti ennen jakelua. Valmiin tuotteen pH on 6,8–7,2. Maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 2 viikkoa valmistamisen jälkeen. (CHROMagar™ ESBL. 2017.)



Kuvio 8: ESBL-malja

4.1.2 MRSA-malja

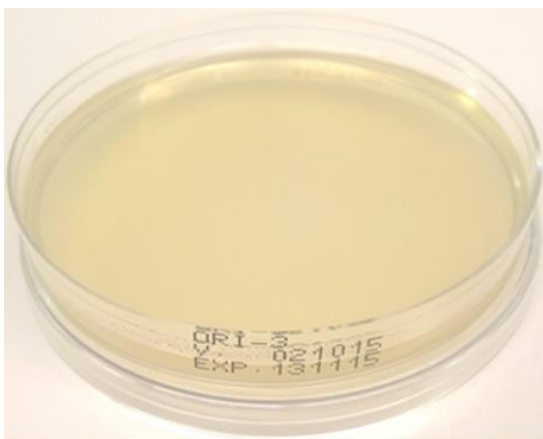
MRSA-malja (kuvio 9) on kromogeeninen elatusaine, jota käytetään *Staphylococcus aureus* -bakteerin tunnistamisessa. Elatusaine valmistetaan valmiista CHROMagar™ MRSA jauheesta. Jauheen lisäksi maljapohjaan sisältyy myös MRSA suplementti lisäaine. Maljaa käytetään metisilliini resistentin *Staphylococcus aureus* -bakteerin eristämiseen. Jauhemainen maljapohja liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja annetaan sekoitua huolellisesti ennen autoklavointia. Seos autoklavoidaan 110 °C:ssa 4 minuuttia, jonka jälkeen pohja jäähdytetään jakelulämpötilaan. Ennen jakelua seokseen lisätään MRSA-suplementti ja annetaan sen sekoittua huolellisesti ennen jakelua. Valmiin tuotteen pH on 6,7–7,1. Maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa valmistamisen jälkeen. (CHROMagar™ MRSA. 2017.)



Kuvio 9: MRSA-malja

4.1.3 Ori-malja

Ori-malja (kuvio 10) valmistetaan CHROMagar™ Orientation jauheesta ja sen on kehitetty virtsatiepatogeenien tunnistamiseen. Elatusaineena se on kuitenkin yleisravintoagar ja soveltuu näin ollen myös laajasti muuhun bakteeridiagnostiikkaan. CHROMagar™ Orientation on helposti muunneltavissa muihinkin käyttötarkoituksiin, kuten antibiooteille resistenttien bakteerien diagnostiikkaan lisäämällä siihen erilaisia lisäaineita. Maljapohja liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja annetaan sekoittua huolellisesti ennen autoklavointia. Maljapohjaa autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen se jäähdytetään 45–50 °C:seen. Valmiin tuotteen pH on 6,8–7,2. Maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 2 kuukautta valmistamisen jälkeen. (CHROMagar™ Orientation. 2017.) HUSLAB:n ohjeistuksen mukaan maljoja voi säilyttää valmistamisen jälkeen jääkaappilämpötilassa korkeintaan 6 viikkoa (Savolainen 2015).



Kuvio 10: Ori-malja

4.1.4 SCarba-malja

Scarba-malja (kuvio 11) on CHROMagar™ mSuperCARBA™ -jauheesta valmistettu kromogeeninen elatusaine, jonka toiminta perustuu karbapenemaasi-entsyymien osoittamiseen. Elatusaine reagoi herkästi pieneenkin karbapenemaasimäärään. Elatusaineella voidaan tutkia useita karbapenemaaseja tuottavia eli karbapenemiresistenttejä bakteereita. SCarba malja valmistetaan valmisjauheesta liuottamalla se ionivaihdettuun veteen ja lisäämällä joukkoon SCarba supplementti S1 ja annetaan niiden sekoittua huolellisesti ennen autoklavointia. Sekoittamisen jälkeen seos autoklavoidaan 100 °C:ssa 10 minuuttia ja jäähdytetään tämän jälkeen 45–50 °C:seen. Jäähdytettyyn seokseen

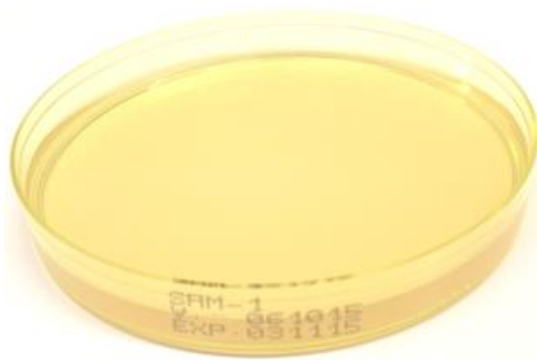
lisätään vielä SCarba supplementti S2 ja annetaan sen sekoittua huolellisesti ennen jakelua. Valmiin tuotteen pH on 7,0–7,4 ja sen säilyvyys on valmistamisen jälkeen jääkaappilämpötilassa 5 viikkoa. (CHROMagar™ mSuperCARBA™. 2017).



Kuvio 11: SCarba-malja

4.1.5 SAM-malja

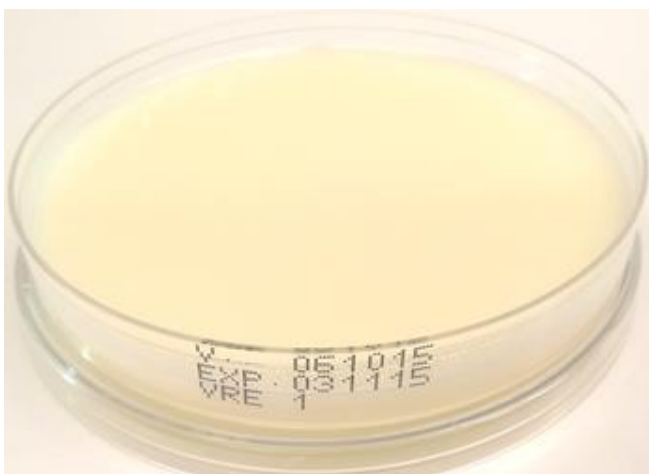
SAM-malja (kuvio 12) on CHROMagar™ *Staph aureus* -jauheesta valmistettu kromogeeninen elatusaine ja sitä käytetään *Staphylococcus aureus* -bakteerin tunnistamiseen. Jauhemainen maljapohja liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja annetaan sekoittua huolellisesti ennen autoklavointia. Seos autoklavoidaan 110 °C:ssa 4 minuuttia, jonka jälkeen se jäähdytetään jakelulämpötilaan. Valmiin tuotteen pH on 6,7–7,1 ja säilyvyys valmistamisen jälkeen jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa. (CHROMagar™ *Staph aureus*. 2017.)



Kuvio 12: SAM-malja

4.1.6 VRE-malja

VRE-malja (kuvio 13) on CHROMagar™ VRE -jauheesta valmistettu kromogeeninen elatusaine. VRE-maljaa käytetään vankomysiiniresistenttien enterokokkien (*Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*) tunnistamiseen ja erotteluun muista bakteereista pesäkemorfologian perusteella. VRE-maljalla *Enterococcus faecalis* muodostaa roosan tai violetinharmahtavan pesäkkeen. Muut bakteerit ovat maljalla sinisiä tai niiden kasvu estyy kokonaan. Jauhemainen maljapohja liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja annetaan sekoittua huolellisesti ennen autoklavointia. Seos autoklavoidaan 110 °C:ssa 4 minuuttia, jonka jälkeen seos jäähdytetään jakelulämpötilaan. Ennen jakelua seokseen lisätään VRE-suplementti ja annetaan sen sekoittua huolellisesti ennen jakelua. Valmiin tuotteen pH on 6,6–7,0 ja säilyvyys valmistamisen jälkeen jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa. (CHROMagar™ VRE. 2017.)



Kuvio 13: VRE-malja

4.2 Herkkyysmaljat

Bakteereille voidaan määrittää herkkyys eri antimikrobisille aineille. Todellinen herkkyys vaihtelee kuitenkin ympäristötekijöiden, kuten märkäeritteen määrän, kudoksen pH:n ja happiosapaineen mukaan. Tästä syystä bakteerilääkettä annettaessa pyritään kudoksessa lääkepitoisuuteen, joka on 2–4 kertaa suurempi, kuin pienin lääkepitoisuus, joka estää bakteerien kasvun. Herkkyystutkimuksissa on käytössä kansainvälinen herkkyysluokitus, joka perustuu kolmeen herkkyysluokkaan: S, I ja R. S eli suscep-

tible tarkoittaa, että bakteeri on herkkä lääkeaineelle ja sitä voidaan käyttää infektion hoidossa. I eli intermediate tarkoittaa, että bakteerin herkkyys lääkeaineelle on vähentynyt tai sen herkkyystä ei ole varmuutta. Tällaisissa tapauksissa lääkettä voidaan käyttää paikallishoidossa sekä joissakin tapauksissa suurina annoksina yleisinfektioiden hoidossa. R eli resistant tarkoittaa, että lääke ei tehoa bakteeriin eikä sen käytöstä ole hyötyä infektion hoidossa. (Carlson – Koskela 2011: 43–44)

Herkkyytestinä voidaan käyttää esimerkiksi kiekkodiffuusiomenetelmää, joka on yksinkertainen, halpa ja yleisesti käytössä oleva menetelmä. Tutkittavasta bakteerista tehty suspensio levitetään tasaisesti elatusainemaljalle, jonka jälkeen sen päälle laiteaan antibioottikiekot, jotka sisältävät eri lääkeaineita tiettyinä pitoisuuksina. Lääkeaine imeytyy kiekoista elatusaineeseen samalla, kun bakteerit alkavat kasvaa. Mikäli antibiootilla on bakteerin kasvua estävä vaikutus, kiekon ympärille muodostuu estorengas. Estorengaan halkaisija mitataan ja mitä suurempi estorengas on, sitä herkempi bakteeri on lääkeaineelle. (Carlson – Koskela 2011: 44) Maljan toimivuuteen ja antibioottien imeytymiseen vaikuttaa kasvualustan ominaisuuksista eniten agarin paksuus ja pH (BD Mueller Hinton Fastidious Agar (MH-F). 2016).

4.2.1 Mueller Hinton eli MH-malja

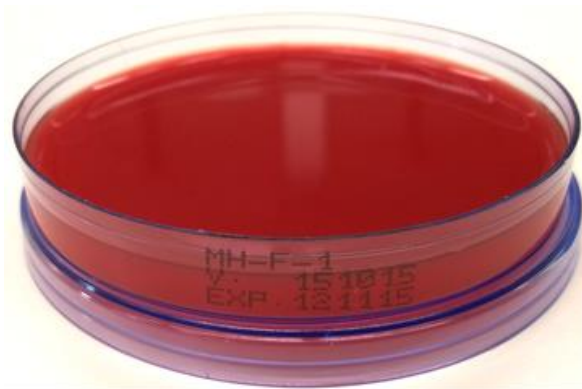
MH-maljaa (kuvio 14) käytetään herkkyysmäärittämisessä muun muassa enterobakteereille, enterokokeille ja stafylokokeille. Malja valmistetaan valmiista Mueller Hinton II jauheesta liuottamalla se ionivaihdettuun veteen ja autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen maljapohja jäähdytetään jakelulämpötilaan. Valmiin tuotteen pH on 7,2–7,4 ja maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa valmistamisen jälkeen. (Savolainen 2015c.) Maljan toimivuuteen ja antibioottien imeytymiseen vaikuttaa kasvualustan ominaisuuksista eniten agarin paksuus ja pH. (BBL™ Mueller Hinton II Agar. 2006.)



Kuvio 14: MH-malja

4.2.2 Mueller Hinton Fastidious eli MH-F-malja

MH-F-malja (kuvio 15) on herkkyysmalja, jota käytetään kasvuvaatimuksiltaan vaativille bakteereille, kuten streptokokeille ja hemofiluksille. MH-F malja on Mueller Hinton pohjainen malja, johon lisätään ennen jakelua NAD 10mg/ml -lisäainetta (nikotiiniamidadieniinidinukleotidi). Jakeluvaiheessa maljaan lisätään myös hevosen verta veripumpun avulla. Valmiin tuotteen pH on 7,2–7,6 ja maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa valmistamisen jälkeen. (Savolainen 2015d.) EUCAST suosittelee käyttämään MH-F maljaa vaativille bakteereille. (BD Mueller Hinton Fastidious Agar (MH-F). 2016.)



Kuvio 15: MH-F-malja

4.3 Verta ja/tai antibioottia sisältävät elatusaineet

Elatusaineita voidaan rikastaa verellä tai veren rakenne voidaan rikkoa kuumentamalla sitä valmistusprosessin aikana. Verta sisältävät elatusaineet ovat ravinnerikkaita

yleiselatusaineita. Oman alaluokkansa luovat elatusaineet, jotka sisältävät antibiootteja. Antibiooteilla on erilaisia vaikutusmekanismeja, joita voidaan hyödyntää myös maljojen valmistamisessa. (Carlson - Koskela 2011: 41–42) Tässä työssä käsiteltävät verta ja/tai antibioottia sisältävät maljat ovat CO-, FAA-, suklaa, TM5-, veri ja NV-maljat. Tässä työssä käsiteltävien elatusaineiden antibiootit on esitelty taulukossa 3.

Verta sisältävissä maljoissa ei ole sokereita, joka mahdollistaa beta-hemolyyttisten streptokokkien hemolyysin elatusaineella. Lampaan veren on todettu parantavan A-ryhmän streptokokin hemolyysiä maljalla. Hevosien verellä taas saadaan paras hemolyysi esimerkiksi *Haemophilus haemolyticus* -bakteerilla, joka muistuttaa Streptokokkien tuottamaa hemolyysiä. Veriagareissa käytetty happopitoisuus (pH 6,8 ± 0,2) parantaa hemolyyttisiä reaktioita ja on tueksi Streptokokkien ja Pneumokokkien kasvu. Matala pH auttaa stabilisoimaan punasoluja tuottaen selkeämmän hemolyysivyöhykkeen. (70133 Blood Agar Base (hocolate Agar, Base). 2013.)

Taulukko 3. maljoissa käytettävät antibiootit

Antibiootti	Kohde bakteerit
Amfoterisiini	Amfoterisiini estää hiiva- ja rihmasienten kuten <i>Aspergillus</i> spp. ja <i>Candida</i> spp. kasvua. Se estää tehokkaasti myös dimorfisten (kaksijakoisten) sienten kasvua. (Lockhart - Warnock 2015: 2228.)
Klindamysiini	Estää tehokkaasti grampositiivisten bakteerien kasvua kuten esimerkiksi: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Str. pneumoniae</i> , <i>Str. viridans</i> ja <i>Str. bovis</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>B. cereus</i> ja <i>Nocardia</i> spp. Suurin osa aerobisista gramnegatiivisista bakteereista on resistenttejä klindamysiinille. Suurin osa anaerobisista bakteereista on herkkiä klindamysiinille. (J. Spížek - T. Řezanka. 2004.)
Kolistiini (Polymyksiini E)	Suurin osa gramnegatiivisista sauvabakteereista on herkkiä kolistiinille. Proteukset, gramnegatiiviset kokit, <i>Bacteroides fragilis</i> sekä melkein kaikki grampositiiviset bakteerit ovat luonnostaan resistenttejä kolistiinille. (Järvinen - Huovinen - Vaara ym. 2011: 186.)
Kolistiini- oksoliinihappo	Kolistiinin ja oksoliinihapon seos estää gramnegatiivisten bakteerien sekä lähes kaikkien gram-positiivisten bakteerien paitsi streptokokkien kasvun. (Coba selective medium. 2018).
Oksoliinihappo (Oxolinic)	Estää gram-negatiivisten bakteerien kasvua. (Oxolinic acid. 2018).

Neomysiini	Neomysiini estää hyvin gramnegatiivisten bakteerien kasvua, myös sellaisten, jotka ovat resistenttejä monille muille antimikrobisille aineille. Neomysiini estää myös enterobakteerien, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ja joidenkin non-fermentatiivisten opportunistisauvojen kasvun. (Järvinen - Huovinen - Vaara ym. 2011: 162.)
Trimetopriimi	Trimetopriimi estää monien grampositiivisten kokkien ja useimpien gramnegatiivisten sauvojen kasvun. Resistenttejä trimetopriimille ovat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , suurin osa anaerobisista bakteereista, mykobakteerit sekä <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . (Lewis – Bush 2015: 1191)
Vankomysiini (Vancosin)	Estää vain grampositiivisia bakteereita, kuten esimerkiksi <i>Staphylococcus aureus</i> sekä muut stafylokokit, <i>Streptococcus pyogenes</i> , useimmat viridans- ryhmään kuuluvat streptokokit, pneumokokki, useimmat enterokokit, basillukset, klostridit ja difteroidit. Jotkin grampositiiviset bakteerit ovat luonnostaan resistenttejä vankomysiinille, kuten esimerkiksi laktobasillit. (Vaara – Huovinen 1998:389-390.)

4.3.1 Kolistiini-oksoliinihappo-malja eli CO-malja

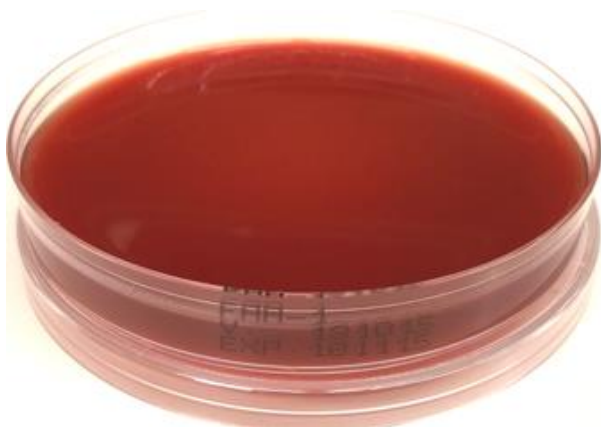
CO-maljan (kuvio 16) pohjana on Oxoidin sheep blood agar base -jauhe, joka liuotetaan ionivaihdettuun veteen. Seos autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen se jäähdytetään 50 °C:seen. Jäähdytyksen jälkeen, ennen jakelua seokseen lisätään aseptisesti steriiliä lampaanverta. Valmiin tuotteen pH on 7,1–7,5. (Thermo Scientific 2018a) Seokseen lisätään myös kolistiini-oksoliinihappo -liuos, jonka annetaan sekoittua huolellisesti ennen jakelua. Verin lisäys tapahtuu veripumpun avulla. Maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa valmistamisen jälkeen. CO-malja on valikoiva streptokokki-malja, joka estää gram-negatiivisten sauvojen, stafylokokkien, basillusten ja difteroidien kasvua. (Savolainen. 2015b.)



Kuvio 16: CO-malja

4.3.2 Fastidious Anaerobe agar eli FAA-malja

FAA-malja (kuvio 17) on ravinnerikas yleiselatusaine, jolla pystytään kasvattamaan useimmat kliinisesti merkittävät anaerobiset bakteerit. Alusta sisältää peptonia, joka edesauttaa bakteerien kasvua tehokkaasti. Tärkkelyksen ja natriumkarbonaatin tehtävänä on poistaa toksisuutta ja hemiini taas lisää joidenkin bakteerilajien värinmuodostusta. Kasvutekijöiksi pohjaan on lisätty kysteiini, arginiini sekä pyrofosfaatti. Vetyperoksidia neutralisoivaksi tekijäksi pohjaan on lisätty pyruvaattia, joka toimii myös joidenkin bakteerien energian lähteenä. Lisäksi joidenkin anaerobisten bakteerien kasvutekijöiksi maljaan on lisätty K-vitamiinia, natriumsukkinaattia ja 0,1 % glukoosia. Vähäinen glukoosin määrä estää happo- ja alkoholipitoisuuden nousemisen niin korkeaksi, että se estäisi pesäkkeiden muodostumista. Valmiin tuotteen pH on 7,0–7,4. Jakeluvaiheessa seokseen lisätään aseptisesti steriiliä lampaanverta (Fastidious Anaerobe Agar. 2018.) Maljapohjan kuivajauhe liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja seosta autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen seos jäädytetään jakelulämpötilaan. Verilisäys seokseen tapahtuu jakeluvaiheessa veripumpun avulla. Maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa valmistamisen jälkeen. (Iivonen 2016b.)

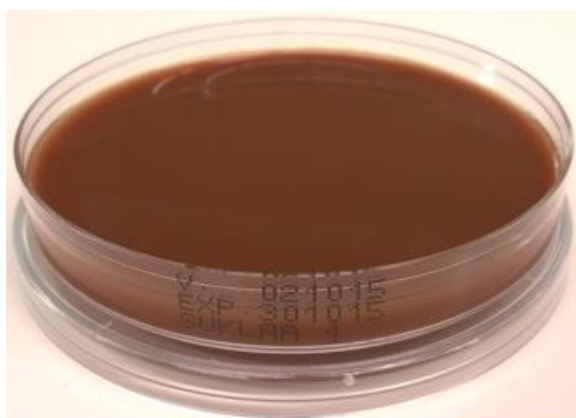


Kuvio 17: FAA-malja

4.3.3 Suklaamalja

Suklaamalja (kuvio 18) on ravinnerikas yleiselatusaine. Malja valmistetaan Trypticase soy agarista (TSA), Muller Hiton II agarista (MH), lampaanverestä ja IsoVitallex -lisäaineesta. TSA- ja MH- jauheet liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja seosta autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen seos jäähdytetään 75 °C:seen verenlisäämistä varten. Veren lisäämisen jälkeen seos jäähdytetään jakelulämpötilaan, jonka jälkeen lisätään lisäaine ja annetaan sen sekoittua 5 minuuttia ennen jakelua. Valmiin tuotteen pH on 7,2–7,4 ja säilyvyys valmistamisen jälkeen jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa. (Savolainen 2016a.)

Elatusainetta on rikastettu, jotta vaativatkin bakteerit kasvavat maljalla. Elatusaineen sisältämistä aineista tärkeimpiä ovat peptoni, tärkkelys, naudan sydänlihauute ja lampaan veri. (Atlas - Snyder 2015: 332)

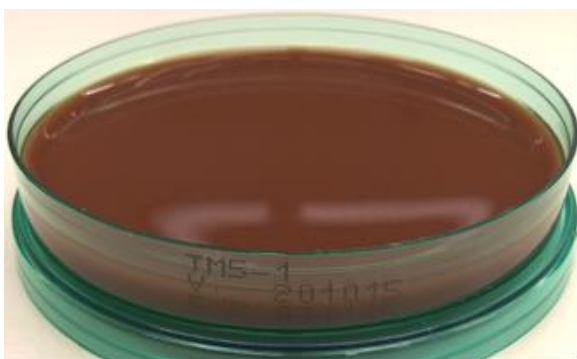


Kuvio 18: Suklaamalja

4.3.4 Thayer Martin 5 eli TM5-malja

Thayer martin 5 elatusainetta käytetään vaativien bakteereiden, kuten Neisserioiden viljelemiseen. Elatusaine sisältää peptonia, hemoglobiinia, aminohappoja, glukoosia, nukleotideja, rautaa ja vitamiineja. (Atlas - Snyder 2015: 345) Antimikrobisina aineina elatusaineessa on vankomysiini, amfoterisiini, kolistiini, klindamysiini ja trimetopriimi.

TM5-malja (kuvio 19) valmistetaan GC medium base ja Proteose Peptone No. 3 jauheista. Jauheet liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja seosta autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen seos jäähdytetään 75 °C:seen veren lisäämistä varten. Veren lisäämisen jälkeen seos jäähdytetään jakelulämpötilaan. Ennen jakelua lisätään lisäaineet ja annetaan sekoittua 5 minuuttia ennen jakelua. Valmiin tuotteen pH on 7,2–7,4 ja säilyvyys valmistamisen jälkeen jääkaappilämpötilassa 2 viikkoa. (Savolainen 2016b.)



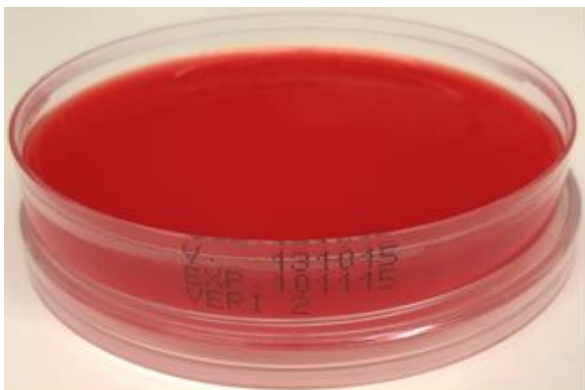
Kuvio 19: TM5-malja

4.3.5 Verimalja

Veri-malja on ravinnerikas yleiselatusaine, jota käytetään tutkittaessa erityisesti streptokokkien kykyä aiheuttaa hemolyysiä. Lampaan veren käytön on todettu parantavan useimpien bakteerien, erityisesti streptokokkien, kasvua. *Streptococcus pyogenes* -bakteerin aiheuttama hemolyysi on lampaanverta käytettäessä selkeämpi kuin esimerkiksi hevosen verta käytettäessä. (BLOOD AGAR BASE (SHEEP). 2018.)

Veri-maljan (kuvio 20) pohjana on Oxoidin sheep blood agar base -jauhe, joka liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja seos autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen se jäähdytetään jakelulämpötilaan. Jakeluvaiheessa seokseen lisätään asepti-

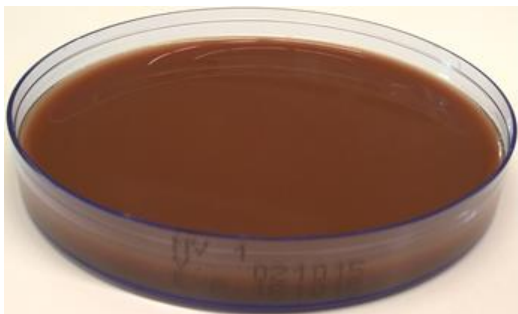
sesti steriiliä lampaanverta. Valmiin tuotteen pH on 7,1–7,5. Säilyvyys valmistamisesta jälkeen jääkaappilämpötilassa 4 viikkoa. (Savolainen 2015f.)



Kuvio 20: Veri-malja

4.3.6 Neomysiini-vankomysiini-malja eli NV-malja

NV-malja (kuvio 21) on anaerobiviljelyssä käytettävä valikoiva elatusaine. Malja valmistetaan LabM:n Blood agar base no. 2 jauheesta, johon on lisätty neomysiinisulfaattia. Maljapohja liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia. Maljapohja jäähdytetään 75 °C:seen, jossa aseptisesti lisätään lampaanveri, jonka jälkeen maljapohja jäähdytetään jakelulämpötilaan. Ennen jakelua seokseen lisätään vielä lisäaine, joka sisältää vankomysiiniä (vancosin) ja menadionia (Savolainen 2015). Menadioni on synteettistä K3-vitamiinia (Paakkari 2016). Valmiin tuotteen pH on 7,2–7,6. Maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 2 viikkoa valmistamisen jälkeen. (Savolainen 2015e.)



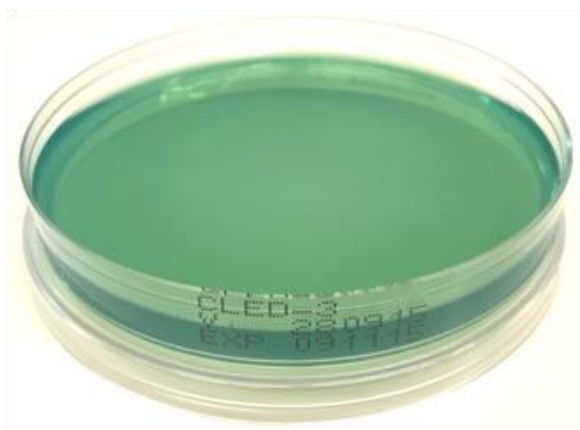
Kuvio 21: NV-malja

4.4 Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar eli CLED-malja

CLED-malja (kuvio 22) eli kystiini-laktoosi-agar on elatusaine, jossa elektrolyyttejä on vähän. Elektrolyyttien vähäinen määrä estää *Proteus*-lajien kasvaessa niiden aiheuttamaa huntuumisilmiötä. Kun *Proteus mirabilis* -bakteeri kiinnittyy agarin pintaan, se kasvaa ensin paikallaan, liikkuen vain vähän. Bakterisolun eriytyminen swarmer-muodoksi mahdollistaa sen kiinnittymisen kiinteisiin pintoihin. Bakterin swarmer-muodoissa bakteerista tulee pitkä polyploidinen solu, jolle tunnunsomaista on suuri pituus ja hyperflagellaatio. Lisäksi swarmer-muotoon liittyy lipopolysakkaridikerroksessa, peptidoglykaanissa ja rasvahappokoostumuksessa olevat muutokset, jotka mahdollistavat solujen liikkumisen yhtenä ryhmänä. Tämä rinnakkaismuodostelma aiheuttaa ravinnerikkaalla maljalla esiintyvän huntuumisilmiön. Solulautta muodostuu kapsulaarisen polysakkaridin muodostamasta niin kutsutusta lietteestä. Lietteen muodostumista on mahdollista vähentää rajoittamalla elatusainealustassa olevan glutamiinin, putresniinin, arginiinin, histidiinin, malaatin ja ornitiinin määrää. Lisäksi elatusaineen matala (5,2) ja korkea (8,2) pH pitoisuus edesauttavat bakteerin flagellahybridien syntymistä. Happamuutta säätämällä voidaan vaikuttaa bakteerin hyperflagellaatioon. (Schaffer – Pearson 2015.)

Malja on tarkoitettu virtsaviljelyille ja se on suunniteltu vahvistamaan virtsassa esiintyvien taudinaiheuttajien kasvua. Patogeenit ilmenevät maljalla usein lajityypillisessä pesäkemorfologiassa ja ne voidaan tunnistaa alustavasti maljalta. Esimerkiksi *Escherichia coli* -bakteeri ilmenee maljalla keltaisina pesäkkeinä, keltaiseksi muuttuneella agarilla. Malja sisältää pH-indikaattorina bromitymolisinistä, jolloin laktoosia pilkkovien bakteerien, kuten *E.colin*, aiheuttama pH:n aleneminen näkyy värimuutoksena vihreästä keltaiseen. (CLED Agar. 2018.)

CLED-malja valmistetaan BD:n kuivasta valmisjauheesta, joka liuotetaan ionivaihdettuun veteen. Seos autoklavoidaan 121 °C:ssa 15 minuuttia ja jäähdytetään jakelulämpötilaan. Valmiin tuotteen pH on 7,1–7,5. (CLED Agar. 2018.) Maljat säilyvät jääkaappilämpötilassa 6 viikkoa valmistamisen jälkeen (Savolainen 2015a).



Kuvio 22: CLED-malja

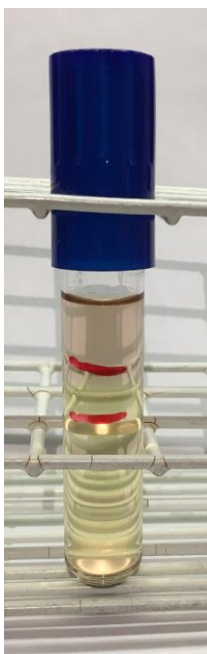
4.5 Tioglykolaatti-putki eli Tio-putki

Tioglykolaatti on nestemäinen elatusaine, joka soveltuu sekä anaerobisten että aerobisten bakteerien viljelyyn. Tio-liuosta voidaan käyttää esimerkiksi steriiliystesteissä. Tio-putket (kuvio 23) valmistetaan Thioglycollate medium U.S.P. jauheesta sekoittamalla jauhe ionivaihdettuun veteen, jonka jälkeen seos keitetään. Keittämisen jälkeen seokseen lisätään viileää ionivaihdettua vettä, jotta liuoksesta saadaan huoneenlämpöistä jakelua varten. Liuos jaellaan jakelukoneella putkiin ja korkitetaan. Jaellut putket steriloidaan autoklaavissa 121 °C:ssa 15 minuuttia. Valmiin tuotteen pH on 6,9–7,3. (THIOGLYCOLLATE MEDIUM USP. 2018.)

HUSLABissa käytetään Tio-putkia, jotka rikastetaan ennen jakelua hemiinillä ja K1-vitamiinilla. Putket säilyvät huoneenlämmössä 2 kuukautta valmistamisen jälkeen. Säilyvyyttä voidaan seurata putken yläosassa näkyvän typpirenkaan avulla: jos rengas on paksumpi kuin 1,5 cm, putki ei ole enää käyttökelpoinen. (Iivonen 2017.) Tio-putkessa oleva typpirengas kertoo nesteen hapettumisesta. Thioglycollate medium U.S.P. jauhe sisältää resatsuria, joka toimii hapettumisen indikaattorina. Resatsuri muuttaa hapettuneessaan väriään punaisemmaksi, eli mitä paksumpi typpirengas on, sitä hapettuneempi liuos on. (Fluid Thioglycollate Medium (USP/EP/JP). 2018.)

Perinteinen Tio-elatusainealusta sisältää kaseiinia, glukoosia, hiivauutetta, kystiiniä, natriumtioglykolaattia ja sappea, mutta se ei sisällä hemiiniä eikä K1-vitamiinia. Kun Tio-elatusainetta rikastetaan K1-vitamiinilla ja hemiinillä, sitä voidaan käyttää erilaisiin laadullisiin menetelmiin, kuten erilaisten anaerobisten bakteerien eristämiseen, viljelyyn

ja tunnistamiseen. (Snyder – Atlas 2015: 332; BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin. 2016.) Esimerkiksi joidenkin bakteerien eristäminen näytteestä vaatii usein rikastetun, selektiivisen ja differentiaalisen elatusaineen käyttöä. Rikastettu elatusaine toimii erityisesti haastavien ja hitaasti kasvavien bakteerien eristyksessä sekä fakultatiivisesti anaerobisten bakteerien viljelyssä. Rikastetun tioglykolaatin merkitys diagnostiikassa on iso sellaisten bakteerien viljelyssä ja todentamisessa, joita on näytteessä vain vähän, ne kasvavat hitaasti tai ovat alttiita epäsuotuisille olosuhteille kuten hapelle. Sekä K1-vitamiinin että hemiinin on tutkittu edistävän joidenkin anaerobisten bakteerien kasvua. Putken toiminta perustuu natriumtioglykolaatin kykyyn ylläpitää matalaa happipitoisuutta. K1-vitamiini edistää erityisesti joidenkin *Prevotella melaninogenica* kantojen kasvua ja sen on todettu myös vahvistavan joidenkin *Bacteroides*-lajien ja grampositiivisten itiöivien bakteerien kasvua. Hemiini toimii X-tekijän lähteenä. X-tekijä tehostaa useiden bakteerien kasvua. (BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin. 2016.)



Kuvio 23: Tio-putki

5 Steriiliyden ja toiminnan kontrollointi

Käytettävien elatusaineiden steriiliys tulee tarkastaa ennen käyttöönottoa: myös sellaisten, jotka on ostettu suoraan kaupalliselta valmistajalta. Steriiliys tarkastetaan ottamalla valmistetusta erästä 1–5 % satunnaisotos maljoja ja inkuboimalla niitä lämpökaapissa

48–120 tuntia. Jos kontrollimaljoissa havaitaan inkuboinnin aikana kasvua, tulee koko erä hylätä, eikä sitä saa käyttää. (Ehder 2006.) Elatusaineiden käytössä on erityisen tärkeää, että ne ovat puhtaita, jotta voidaan taata maljalla olevan kasvuston olevan potilaan näytteestä tullutta bakteeristoa, muutoin potilas saattaa saada virheellisen vastauksen.

Toimivuuskontrollilla tarkoitetaan tässä työssä elatusaineen toiminnan kannalta ominaisuuksien testaamista. Toimivuuskontrolloinnilla varmistetaan, että maljalle saadaan kasvamaan riittävän hyvin ne bakteerit, joiden siellä tulisi kasvaa. Mikäli halutut bakteerit eivät kasva maljalla, tämä voi aiheuttaa vääriä negatiivisia tuloksia. Toisaalta selektiivisissä maljoissa on myös joidenkin bakteerien kasvamisen ehkäisemiseksi esimerkiksi antibioottia, jotta halutut bakteerit saadaan kasvamaan, eivätkä ne jää jonkin muun kasvuston alle piiloon. (Ehder 2006.) Maljojen toiminta tarkastetaan tietyn protokollan mukaan, joka sisältää myös kontrollimaljan (ei käytössä kaikilla maljoilla). Maljojen toimintakontrollien protokolla on esitelty liitteessä 1.

Valikoivia elatusaineita kontrolloitaessa käytetään vertailupohjana yleiselatusainetta, josta nähdään konkreettisesti kasvun ero valikoivan ja ei-valikoivan elatusaineen välillä. Erottelevien elatusaineiden kohdalla kontrolloidaan erottelevaa ominaisuutta positiivisella ja negatiivisella kontrollilla. (Ehder 2006.)

Ennen kontrollointia bakteerikannat käsitellään niin, että saadaan jokaiseen tarkoitukseen sopiva bakteeripitoisuus. Joidenkin elatusaineiden kohdalla käytetään suoraa viljelyä bakteeripesäkkeestä, joskin yleisesti ottaen kontrollointia varten tehdään bakteerisuspensio. (Ehder 2006.)

Laadunvalvonta on välttämätöntä riippumatta siitä, onko maljat valmistettu laboratoriossa vai ostettu valmiiksi valmistettuna. Viljelyyn käytettävien maljojen osalta riittävä, bakteerille tyypillinen kasvu ja pesäkemorfologia tulisi olla aina samanlainen jokaisella kontrollikerralla. Selektiivisillä maljoilla tulisi estyä tiettyjen bakteerien kasvu, mutta kuitenkin haluttujen bakteerien kasvun tulisi olla riittävä. (Atlas – Snyder 2015:324–325.)

6 Opinnäytetyön arviointi, pohdinta ja eettisyys

Opinnäytetyössä perehdyttiin maljavalmistusprosessiin, maljojen toimintaperiaateisiin ja laadunvarmistukseen. Prosessista koostettiin kirjallinen raportti, joka mahdollistaa työntekijöiden osaamisen sekä työn mielekkyyden lisäämisen. Opinnäytetyöllä vastattiin työelämän tarpeeseen.

Vaikka opinnäytetyö on pääasiassa tehty HUSLABin elatusaineyksikköön, on opinnäytetyön tuotteena syntyvä raportti yleishyödyllinen kirjallinen teos, jota voidaan hyödyntää myös oppilaitoksen (Metropolia AMK) opiskelijoiden elatusaineiden valmistamisen tietoisuuden lisäämiseen ja ammatillisen osaamisen monipuolistamiseen. Oppilaitoksen tehtäväksi jää huolehtia materiaali opiskelijoiden käyttöön niin, että esimerkiksi Kliinisen mikrobiologian opintokokonaisuudessa materiaalia on mahdollista käyttää yleisimpien maljojen käyttötarkoituksen ja toimintamenetelmän opiskelemiseen.

Opinnäytetyön sisältö muokkautui prosessin edetessä: ideointivaiheessa maljarajauksen suunniteltiin kattavan ainoastaan tärkeimmät käytössä olevat aerobisten bakteerien kasvatusalustat, mutta keskustelujen edetessä nousi esille tarve kattavamman perehdytysmateriaalin luomisesta. Tästä johtuen opinnäytetyöhön otettiin mukaan myös anaerobisille bakteereille soveltuvia kasvatusalustoja.

Aiheen rajauksen haastavuuden lisäksi haasteita kirjallisen raportin kirjoittamiseen loi vähäinen ja vaikeasti löydettävä teoriatieto. Elatusaineiden valmistamisesta ei ole saatavilla kovinkaan paljoa kirjallista tietoa tai tutkimustuloksia. Löytyvä teoriatieto on usein peräisin pitkänkin ajan takaa, eikä päivitettyä tietoa ole. Vanhankin tiedon voidaan katsoa olevan relevanttia, jos uutta tutkimustietoa ei ole, ja vanhat ohjeistukset ovat yhä laboratorioiden käytössä, eikä niissä ole havaittu poikkeamia tai puutteita.

Puutteellisen tiedon vuoksi, työn tekeminen oli hidasta, sillä asioiden selvittäminen vaati useamman lähteen yhtäaikaista tarkastelua ja asioiden yhdistelyä monesta lähteestä. Hajanaisen tiedon yhteen kerääminen aiheuttaa haasteita yhtenäisen ja luotettavan lopputuloksen kannalta. Tulevaisuudessa olisikin hyvä, että aiheesta tehtäisiin kirjallisuuskatsaus, joka koostaisi maljanvalmistusohjeistukset ja toimintamenetelmät yhteen teokseen. Näin tieto saataisiin tutkimuksen kautta vastaamaan nykypäivän tarpeisiin. Kirjallisuuskatsaus ja aiheeseen liittyvät tutkimukset auttaisivat parantamaan elatusai-

neiden laatua ja bakteerikanta spesifisyyttä. Tutkimuksen kautta voitaisiin lisäksi selvittää, miten superbakteereja voitaisiin tunnistaa paremmin elatusaineiden avulla.

Koska työ sisälsi osaltaan myös maljavalmistusprosessin kuvaamisen ja ohjeiden tarkastelun, käytettiin opinnäytetyössä aineistona HUSLAB:n elatusaineyksikön menetelmäohjeita. Lisäksi menetelmäohjeet toimivat yhtenä lähdemateriaalina. Kyseisen lähdemateriaalin luotettavuutta puoltaa HUSLAB:n sisäiset käytännöt, joissa menetelmäohjeet tarkastetaan ennen ohjeistusten hyväksymistä. Vaikka ohjeistus oli osin omaa tuotantoani, voidaan sen täten katsoa olevan luotettavaa. Lisäksi kyseisten ohjeiden oikeellisuus on tarkistettu opinnäytetyön prosessissa. Prosessissa kaikkia ohjeita on tarkasteltu samalla tavalla, tarkastellen ohjeen asiasisältöä kirjallisuuslähteiden valossa. Ohjeissa oleviin virheisiin on puututtu asianmukaisella tavalla kirjoittajasta huolimatta.

Yhtenä opinnäytetyön tavoitteena oli lisäksi hiljaisen tiedon vähentäminen. Hiljainen tieto on suullista tai kirjallista perimätietoa, jonka alkuperää ei voida varmentaa. Opinnäytetyöllä pystyttiin vastaamaan hyvin hiljaisen tiedon luomaan haasteeseen. Opinnäytetyöllä vastattiin muun muassa kysymykseen, miksi lampaanverta käytetään toisissa maljoissa hevosen veren sijaan. Työ myös avasi muita maljojen toimintamekanismeja sekä perustelee teoreettisesti, miksi maljanvalmistuksen protokolla on valvottu menetelmä.

6.1 Työn eettinen näkökulma

Työn suorittamisessa noudatettiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä, kunnioitettiin muiden tutkijoiden tekemää työtä, huomioiden ja viitaten niihin asianmukaisella tavalla. Tutkimuksen suunnittelu, toteutus ja raportointi suoritettiin niin, että työ on hyvien tieteellisten käytäntöjen mukainen aina tutkimusluvan hankkimisesta sopimusteknisiin asioihin. Työhön ei tarvittu rahallisia resursseja, ja se suoritettiin opinnäytetyönä, jolloin työyhteisölle ei syntynyt kuluja.

Lisäksi työssä käytettävä materiaali ja tutkimusaineisto eivät sisältäneet potilasaineistoa eivätkä tietoturvaa vaarantavaa aineistoa, jonka käyttö olisi voinut sisältää moraalisen tai aatteellisen ongelman tai haasteen. Työssä käytettävät resurssit sisälsivät ainoastaan kirjallisen ja suullisen perimätiedon, jonka dokumentointi edistää työyhteisön hyvinvointia ja parantaa työn laatua.

Työtä suoritettaessa on huomioitu myös bioanalyytikon eettiset ohjeet, joiden kohdalla työn voidaan erityisesti katsoa olevan hyvää ammattitaitoa ylläpitävä ja ammatillista osaamista kehittävä. (Bioanalyytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. 2006)

Työssä eettisyydestä on huolehdittu myös huomioimalla työpaikan toiveet. Työpaikan toiveen mukaisesti, työssä käytetyt HUSLAB:n ohjeet eivät ole julkisesti luettavissa.

Lähteet

Atlas, Ronald – Snyder, James 2015. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. Teoksessa Jorgensen, James H (toim.). Manual of Clinical Microbiology; 11th edition (1). Washington: ASM Press. 345.

BD Mueller Hinton Fastidious Agar (MH-F). 2016. BD. Verkkodokumentti.
<<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=35101>> Luettu 16.3.2018.

BBL™ Mueller Hinton II Agar. 2006. BD. Verkkodokumentti.
<[http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007393\(11\)\(0706\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007393(11)(0706).pdf)> Luettu 16.3.2018.

BD BBL™ Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K1 and Hemin. Quality control procedures (Optional). 2016. Verkkodokumentti.
<[http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007509\(15\).pdf](http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007509(15).pdf)>. Luettu 16.3.2018.

Bioanalyttikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. 2006. Suomen Bioanalyttikoliitto ry.

BLOOD AGAR BASE (SHEEP). Thermo Scientific 2018. Verkkodokumentti.
<http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0854> Luettu 27.10.2017.

CLED Agar. 2018. Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition. Verkkodokumentti.
<http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/212218.pdf> Luettu 16.3.2018.

Carlson, Petteri. Koskela, Markku 2011. Bakteriologiset tutkimukset. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – toim. Vaara, Martti. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Helsinki. Duodecim. 41-44. 47-49.

CHROMagar™ ESB. 2017. CHROMagar Verkkodokumentti.
<http://www.chromagar.com/fichiers/1470666387NT_EXT_034_V5.0.pdf> Luettu 18.11.2017.

CHROMagar™ MRSA. CHROMagar. Verkkodokumentti.
<http://www.chromagar.com/fichiers/1450802204NT_EXT_012V8_079V1_MR_WEB.pdf> Luettu 18.11.2017.

CHROMagar™ mSuperCARBA™. CHROMagar. 2017. Verkkodokumentti.
<http://www.chromagar.com/fichiers/1476800118NT_089_EXT_mSuperCARBA_V3.0.pdf> Luettu 18.11.2017.

CHROMagar™ Orientation. CHROMagar. 2017. Verkkodokumentti.
<http://www.chromagar.com/fichiers/1506588583NT_EXT_002_V11.1_NOTICE_RT.pdf> Luettu 18.11.2017.

CHROMagar™ Staph aureus. CHROMagar. 2017. Verkkodokumentti.
<http://www.chromagar.com/fichiers/1425915717NT_EXT_005_V9_TA.pdf> Luettu 18.11.2017.

CHROMagar™ VRE. CHROMagar. 2017. Verkkodokumentti.
<http://www.chromagar.com/fichiers/1476199990NT_EXT_027_V8.0_VR.pdf> Luettu 3.12.2017.

Chromogenic Technology. How does Chromogenic Culture Media technology work?. CHROMagar. 2009. Verkkodokumentti. <http://www.chromagar.com/p-Chromogenic_agar_Technology.html#.Wq-e_9SLRnl> Luettu 19.3.2018.

Coba selective medium. Thermo Scientific. 2018. Verkkodokumentti.
<http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0126&c=UK&lang=EN>. Luettu 20.3.2018.

Ehder, Tapio (toim.). 2006. Mikrobiologian laboratorion elatusaineiden sisäinen laadunvarmistus. J6/2006. MIKES Mittatekniikan keskus. Espoo. Verkkodokumentti.
<<http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2006-J6.pdf>>. Luettu 26.3.2018.

Fastidious Anaerobe Agar. LABM. Verkkodokumentti.
<<http://www.labm.com/products/fastidious-anaerobe-agar.asp>> Luettu 18.11.2017.

Fluid Thioglycollate Medium (USP/EP/JP). LABM. 2018. Verkkodokumentti.
<<http://www.labm.com/products/fluid-thioglycollate-medium-usp-ep-jp.asp>>. Luettu 4.4.2018.

Huovinen, Pentti – Vaara, Martti – Järvinen, Asko 2011. Bakteerilääkkeet. Aminoglykosidit. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Helsinki. Duodecim. 162. 170

livonen, Kirsti 2016a. HUSLAB. Kliininen mikrobiologia. Elatusaineyksikkö. Työpiste: elatusaineiden valmistus. Koneet ja laitteet, työohje.

livonen, Kirsti 2016b. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. FAA-malja (Fastidious Anaerobe).

livonen, Kirsti 2017. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. VRE-malja.

livonen, Kirsti 2018. HUSLAB palvelutuotanto, toimintaohje. Työprosessin Kuvious/Maljavalmistus.

Järvinen, Asko - Huovinen, Pentti - Vaara, Martti 2011. Bakteerilääkkeet. Muita mikrobilääkkeitä. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Helsinki. Duodecim. 186.

Kärpänoja, Pauliina 2007. Kromogeeniset maljat, periaate, tausta. Laaduntarkkailupäivät. Verkkodokumentti
<[http://www.labquality.org/LQ/Pdf.aspx?dir=1&path=B\)%202007%20Labquality-paivat%20Karpanoja_Kromogeeniset_maljat.pdf&type=file&vuosi=2014](http://www.labquality.org/LQ/Pdf.aspx?dir=1&path=B)%202007%20Labquality-paivat%20Karpanoja_Kromogeeniset_maljat.pdf&type=file&vuosi=2014)> Luettu 19.3.2018.

Laitinen, Kirsi. Ratia, Marja 2011. Puhdistaminen, desinfektio ja sterilointi. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.). Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 3. Helsinki. Duodecim. 317.

Lewis, James S – Bush, Karen 2015. Antibacterial Agents. Teoksessa Jorgensen, James H (toim.). Manual of Clinical Microbiology; 11th edition (1). Washington: ASM Press. 1191.

Lockhart, Shawn R - Warnock, David W 2015. Antifungal Agents. Teoksessa Jorgensen, James H (toim.). Manual of Clinical Microbiology; 11th edition (2). Washington: ASM Press. 2228.

Niemelä, Seppo 2002. Mikrobien elintoiminnat. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.). Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy. 193.

Oxolinic acid. 2018. SIGMA-ALDRICH. Verkkodokumentti.
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o0877?lang=fi®ion=FI>>. Luettu. 4.4.2018.

Paakkari, Ilari. 2016. K-vitamiini: koagulaatiosta kalkkiutumiseen. Duodecim. 132/2016:1755–1762. Verkkodokumentti.
<<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/230236/duo13327.pdf?sequence=1>> Luettu 31.3.2018.

Rose Bengal Chloramphenicol Agar. 2018. LABEMA. Verkkodokumentti.
<<https://www.labema.fi/tuote-LAB36-E>>. Luettu 1.4.2018.

Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Mikrobien elintoiminnat. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.). Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy. 196–198.

Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Mikrobiologian menetelmät. Mikrobien tutkiminen. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.). Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy. 57–63.

Savolainen, Taina 2015a. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. CLED-malja.

Savolainen, Taina 2015b. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. CO-malja (Colistin-Oxolinic).

Savolainen, Taina 2015c. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. M-H -malja (Mueller Hinton-malja).

Savolainen, Taina 2015d. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. MH-F -malja (Mueller Hinton Fastidious).

Savolainen, Taina 2015e. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. NV-malja.

Savolainen, Taina 2015f. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. Veri-malja.

Savolainen, Taina 2016a. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. Suklaa-malja.

Savolainen, Taina 2016b. HUSLAB palvelutuotanto, resepti. Thayer Martin 5-malja.

Savolainen, Taina 2018. Kuviot 1–23.

Schaffer, Jessica N. – Pearson, Melanie M. 2015. *Proteus Mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr.* 3(5). Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4638163/>>. Luettu 16.4.2018.

Sojakka, Kirsi – Välimäki, Maija Liisa 2011. *Ammatillinen mikrobiologia*. Helsinki. Opetushallitus.

Spížek J. – Řezanka T. 2004. Lincomycin, clindamycin and their applications. Verkkodokumentti. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-003-1545-7>>. Luettu. 16.3.2018.

THIOGLYCOLLATE MEDIUM USP. Thermo Scientific 2018. Verkkodokumentti. <http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=cm0173&cat=&sec=1&c=uk&lang=en> Luettu 26.11.2017.

Työturvallisuuslaki 738/2002. Annettu Helsingissä 23.8.2002.

Vaara, Martti – Huovinen, Pentti 1998. Käytössä olevat bakteerilääkkeet. Teoksessa Tiilikainen, Anja S – Vaara, Martti – Antti Vaheri (toim.). *Lääketieteellinen mikrobiologia*. Helsinki: Duodecim. 389-390, 393.

70133 Blood Agar, Base (Chocolate Agar, Base). 2013. Product Information. Sigma-Aldrich. Verkkodokumentti. <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/70133dat.pdf>>. Luettu 16.4.2018.

Maljojen toimintakontrolli taulukko

Taulukko on mukaelma HUSLABin maljojen toimintakontrollointi taulukosta. Taulukossa esitellään maljakohtaisesti bakteerikannat sekä niiden mahdollinen kasvu maljalla.

Malja/putki	kontrollikanta ja ATCC numero tai alkuperä	Kasvatus-olosuhteet	Kasvu maljalla
CLED kontrolli: Veri- maljalle	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	1 vrk +35 °C	kasvaa, keltainen pesäke (laktoosi positiivinen)
	<i>Proteus mirabilis</i> , ATCC 29906		kasvaa, vihertävä pesäke (laktoosi negatiivinen)
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		kasvaa, keltainen pesäke
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (B-str), ATCC 13813		kasvaa, pieni vihertävä/keltainen pesäke
Colistin- Oxolinic kontrolli: Veri- maljalle	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ATCC 49619	1 vrk +35 °C CO ₂	kasvaa, alfa-hemolyysi
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , (A) ATCC 19615		kasvaa, beta-hemolyysi
	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		kolistiini-oksoliinihappo/ei kasva
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		oksoliinihappo-inhibitio/ei kasva
	<i>Streptococcus agalactiae</i> , (B-str) ATCC13813		kasvaa, ei norm hemolyysiä
ESBL kontrolli: Cled-maljalle	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , (ESBL) T-34678	1 vrk +35 °C	kasvaa, sininen pesäke
	<i>Escherichia coli</i> , (ESBL) T-90840		kasvaa, vaalea, punertava pesäke
	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922, T-9112		ei kasva, mahd. kefpodoksiimi-inhibitio
FAA kontrolli: FAA-	<i>Clostridium perfringens</i> , ATCC 13124	2-3vrk anaerobi +35 °C	kasvaa, kaksoishemolyysi
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , ATCC 33059		kasvaa

2 (4)

maljalle			
MRSA kontrolli: Veri- maljalle	<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA CCUG 35601, T-24844	1 vrk +35 °C	kasvaa, vaalea, punertava pesäke
	<i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA ATCC 43300, T-24843		kasvaa, vaalea, punertava pesäke
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 12228, T-15507		kefoksitiini-inhibitio/ei kasva
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		ei kasva
Mueller- Hinton	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922 <i>Staphylococcus aureus</i> , 29213 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	1 vrk +35 °C	Kaikki kasvavat, mitataan antibioottikiekkojen esto- renkaiden halkaisija (mm), halkaisijalle on määritetty vaihteluväli, jonka sisällä tuloksen täytyy pysyä.
Mueller- Hinton Fastidious	<i>Haemophilus influenzae</i> , ATCC49766 <i>Streptococcus pneumoniae</i> , ATCC 49619	1 vrk +35 °C CO ₂	Kaikki kasvavat, mitataan antibioottikiekkojen esto- renkaiden halkaisija (mm), halkaisijalle on määritetty vaihteluväli, jonka sisällä tuloksen täytyy pysyä.
NV kontrolli FAA- maljalle	<i>Bacteroides fragilis</i> , ATCC 25285	2-3vrk anaerobi +35 °C	kasvaa
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , ATCC 33059		kasvaa
	<i>Proteus mirabilis</i> , ATCC 29906		neomycin-inhibitio/ei kasva (saattaa kasvaa läpi)
	<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212		vankomycin-inhibito/ei kasva
ORI ei kontrolli maljaa	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	1 vrk +35 °C	kasvaa, vaaleanpunainen pesäke
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , ATCC 13883		kasvaa, sininen pesäke
SCarba kontrolli: Cled-maljalle	<i>S. maltophilia</i> , T-18100	1 vrk +35 °C	kasvaa, väritön
	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922, T-9112		ei kasva
SAM	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923		kasvaa, punainen pesäke

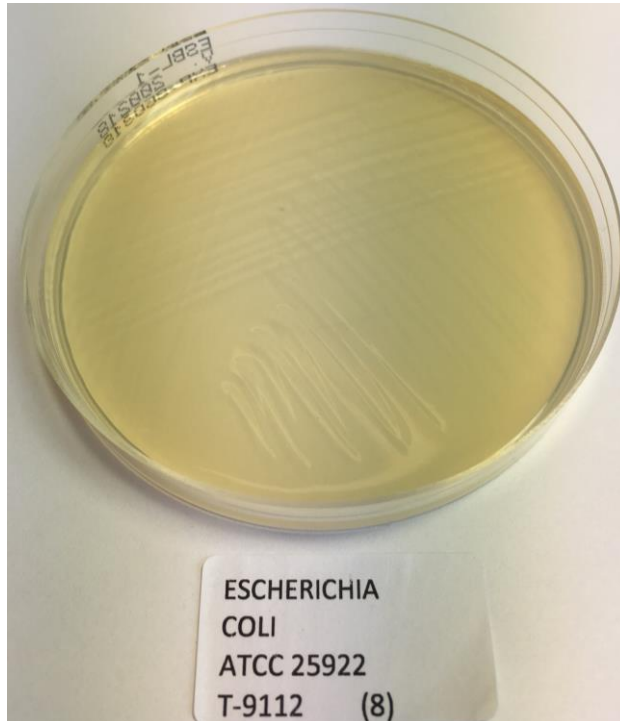
3 (4)

ei kontrolli maljaa	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 12228	1 vrk +35 °C	kasvaa, vaalea tai punertava pesäke
Suklaa kontrolli: Suk- laa-maljalle	<i>Haemophilus influenzae</i> , ATCC 49247	1-3 vrk +35 °C CO ₂	kasvaa
Thayer Martin 5 (TM5) kontrolli: TM1 maljalle	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , ATCC 49226	2 vrk +35 °C CO ₂ , luetaan 1 vrk ja 2 vrk	kasvaa
	<i>Neisseria meningitidis</i> , ATCC 13077		kasvaa
	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922		kolistiini-inhibio/ ei kasva
	<i>Proteus mirabilis</i> , ATCC 29906		trimetopriimi-inhibito/ei kasva
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 12228		vankomysiini-inhibio/ei kasva
	<i>Candida albicans</i> , ATCC 28366		amfoterisiini-inhibio/ei kasva
Veri kontrolli: Veri- maljalle	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ATCC 49619	1 vrk +35 °C CO ₂	kasvaa, alfa-hemolyysi
	<i>Streptococcus pyogenes</i> , (A-str.), ATCC 19615		kasvaa, beta-hemolyysi
	<i>Streptococcus agalactiae</i> , (B-str.) ATCC13813		kasvaa, ei norm. hemolyysiä (normaalisti vai normaalia)
VRE kontrolli: Veri- maljalle	<i>Enterococcus faecium vanA</i> , IHU 77696, T-22547	2 vrk +35 °C	kasvaa, vaaleanpunainen pesäke
	<i>Enterococcus faecalis vanB</i> , ATCC 51299, T-90310		kasvaa, violetit pesäkkeet
	<i>Enterococcus faecium</i> , ATCC 19434, T-12629		vankomysiini-inhibito/ ei kasva
Tio-putki	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923 -> 24h kasvatus -> viljely 1 µl verimaljalle -> kasvatus 1-2 vrk.	1 vrk +35 °C + 1 vrk +35 °C	Kasvaa

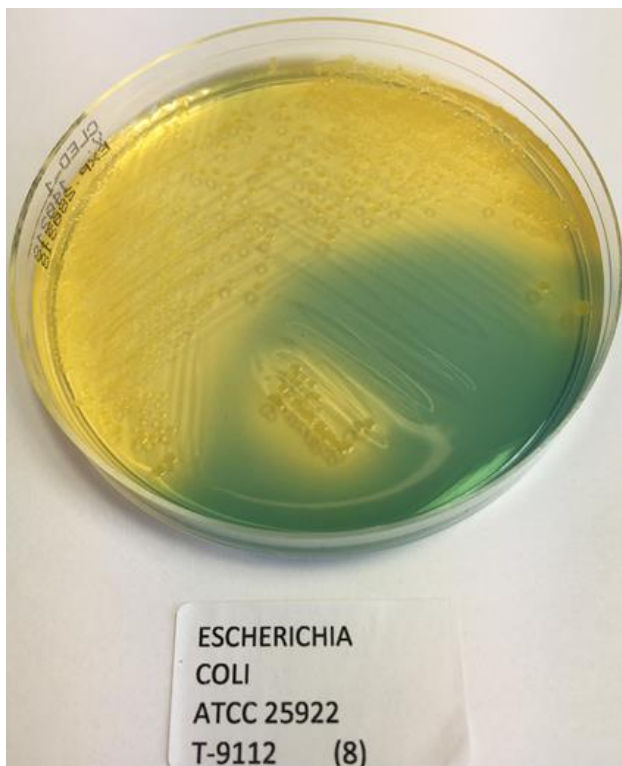
4 (4)

	<i>Bacteroides fragilis</i> , CCUG 35601 -> 24h kasvatus -> vilje- ly 1 µl FAA:lle -> kasvatus 1vrk.	1 vrk +35 °C + 1 vrk +35 °C anaerobissa	Kasvaa
--	---	---	--------

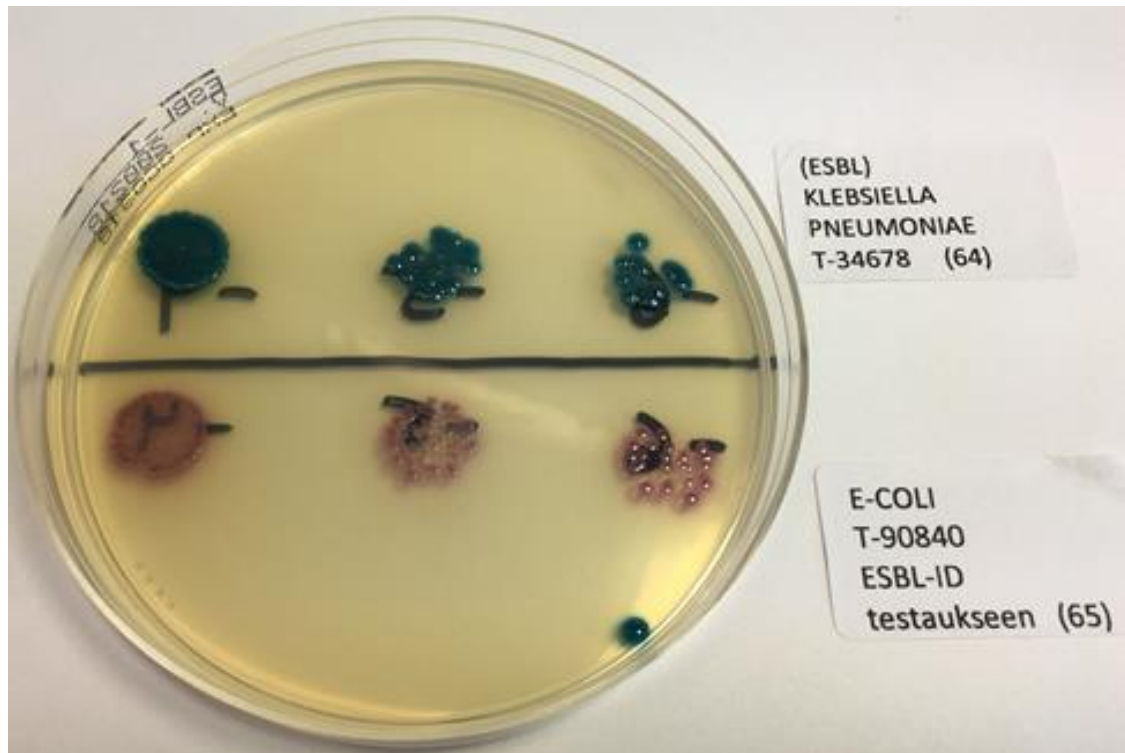
Toimintakontrolli kuvissa toimintakontrollimalja havainnollistaa elatusaineen toimivuutta, kun maljalle viljellään maljan toimintaa kontrolloivaa bakteeria. Toimintakontrollilla kontrolloidaan, että maljalla kasvaa haluttuja bakteereja.



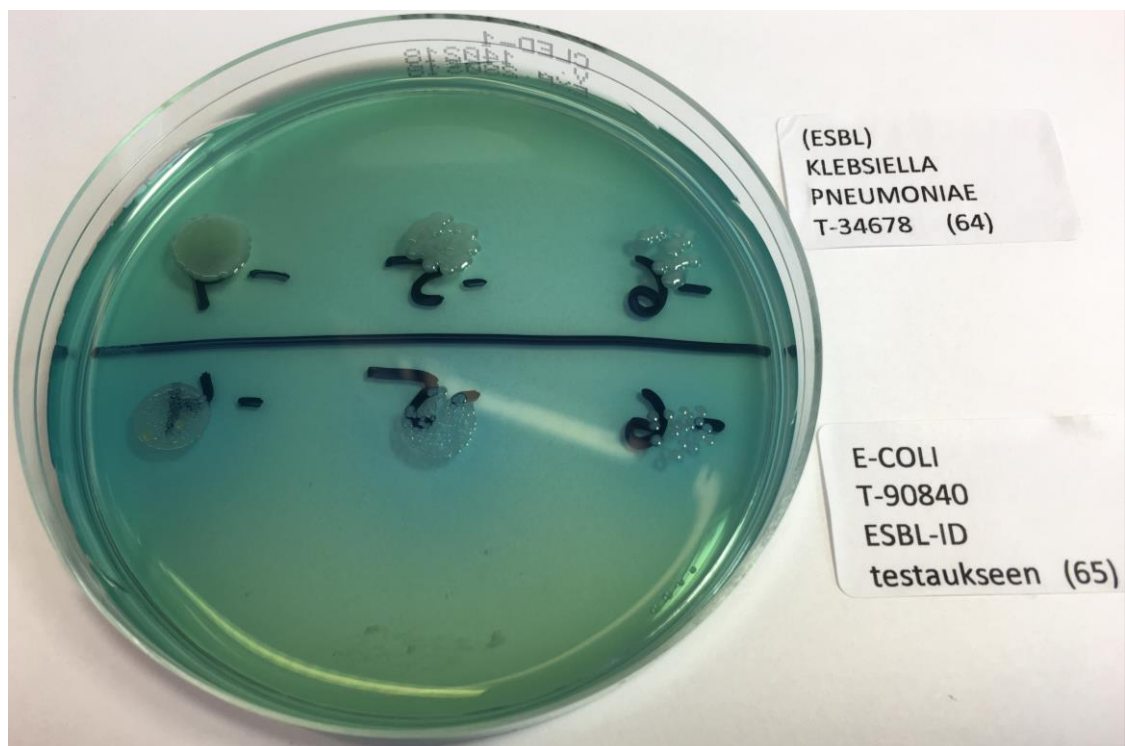
ESBL toimintakontrolli (estää *Escherichia coli* kasvun)



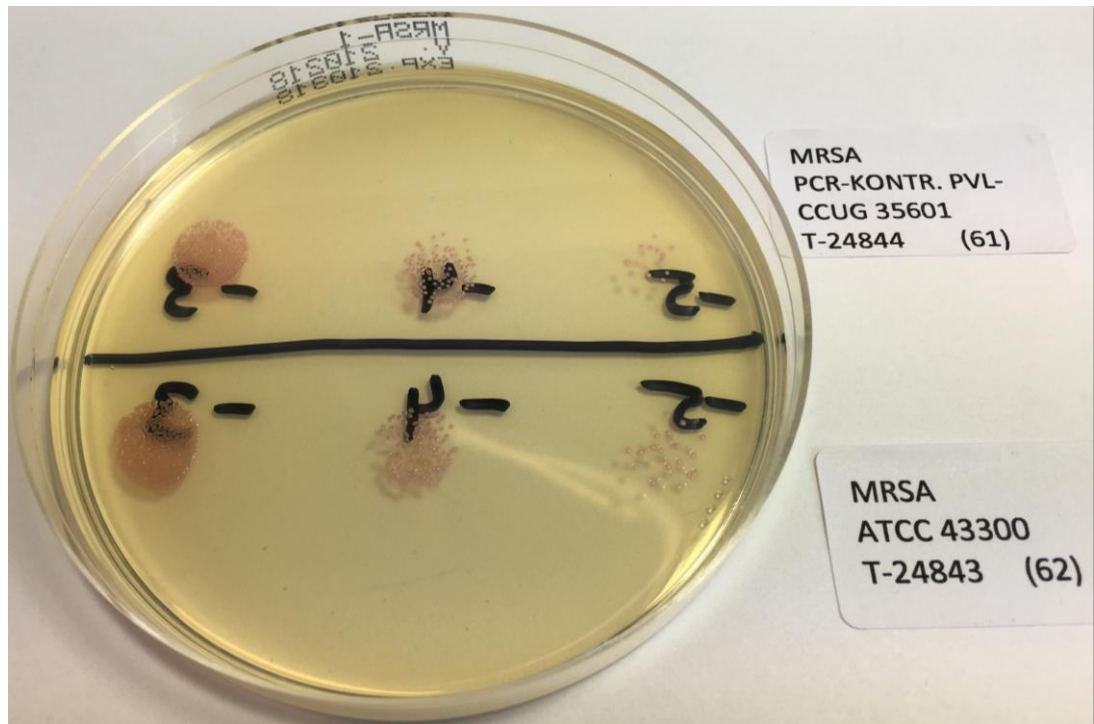
ESBL kontrollimaljana CLED-malja (*E.coli* kasvaa)



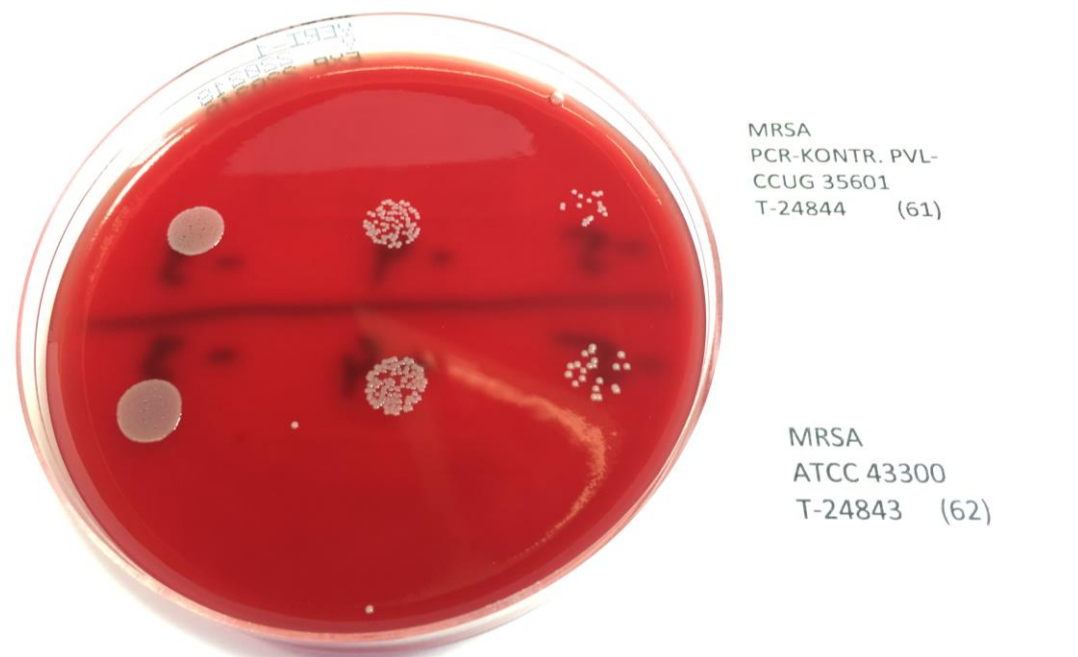
ESBL toimintakontrolli, laimennossarja



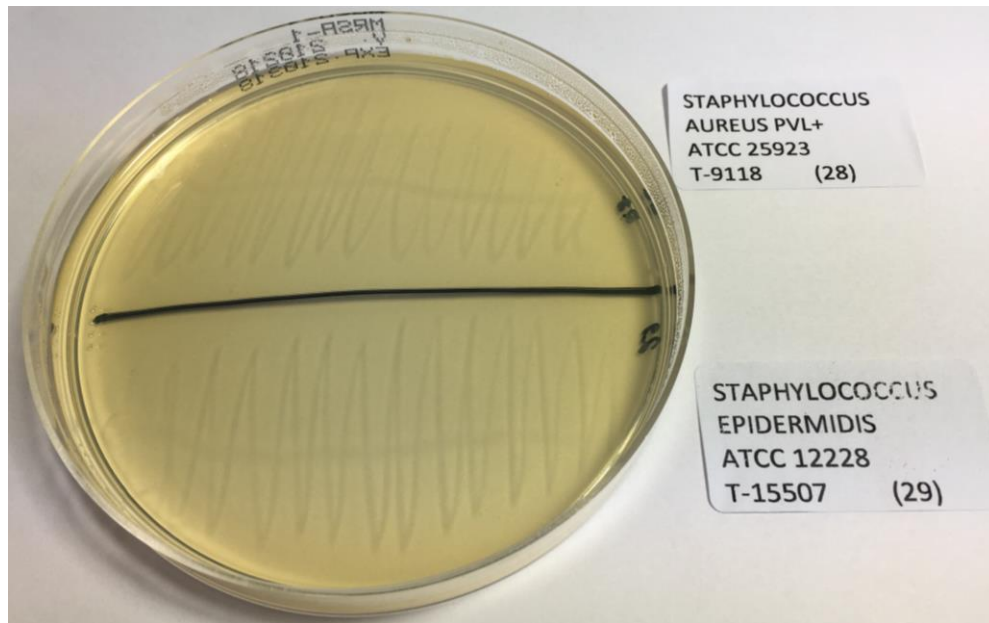
ESBL kontrollimaljana CLED-malja, laimennossarja



MRSA toimintakontrolli, laimennossarja



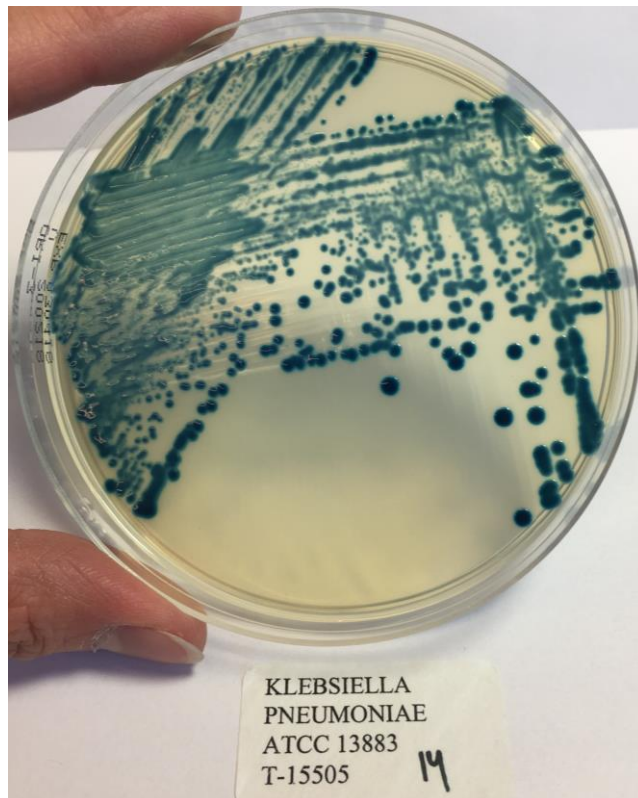
MRSA kontrollimaljana verimalja



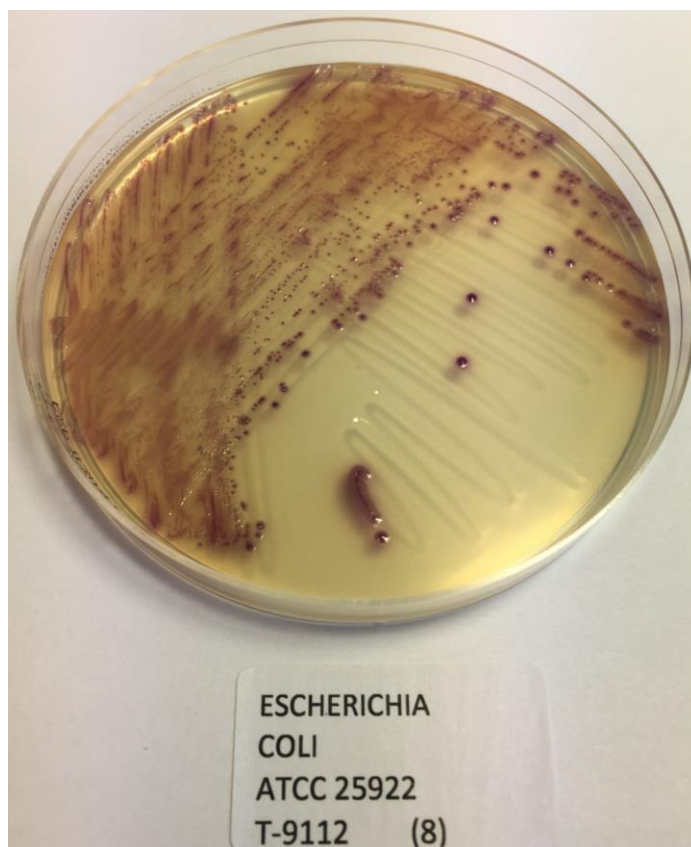
MRSA toimintakontrolli (estää *Staphylococcus. aureus* ja *Staphylococcus. epidermidis* kasvun)



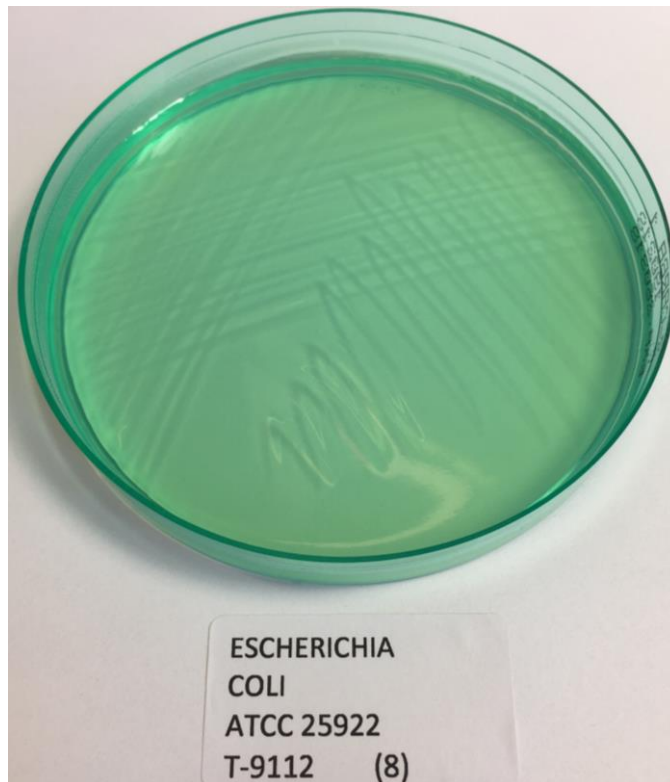
MRSA kontrollimaljana verimalja (*S. aureus* ja *S. epidermidis* kasvaa)



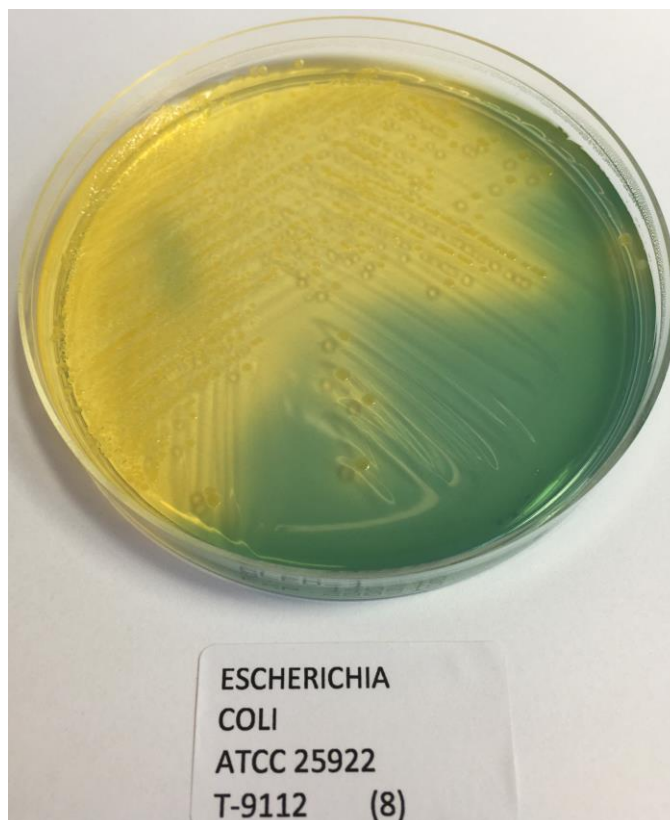
ORI-maljan toimintakontrolli (*Klebsiella pneumoniae* kasvaa sinisenä)



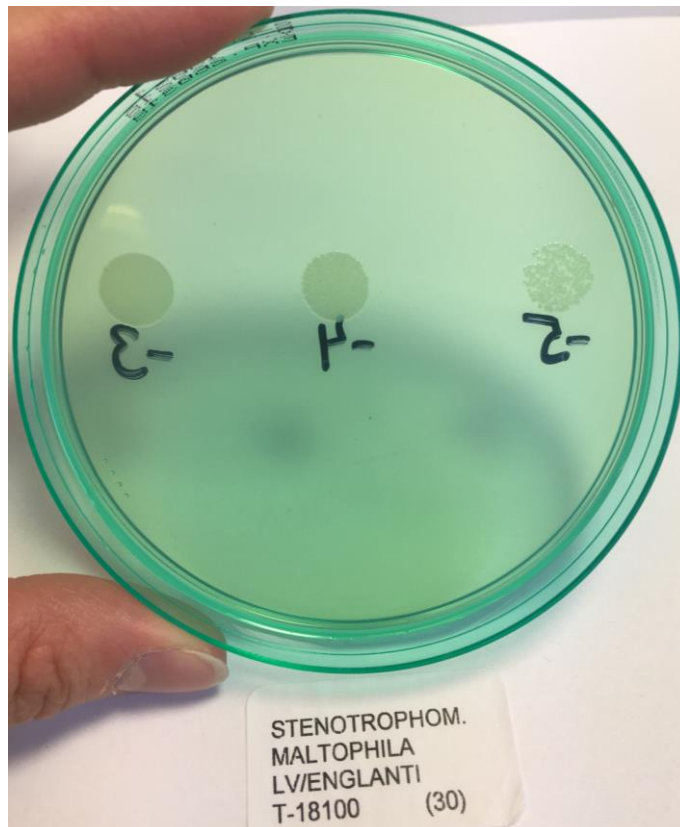
ORI-maljan toimintakontrolli (*E. coli* kasvaa punaisena)



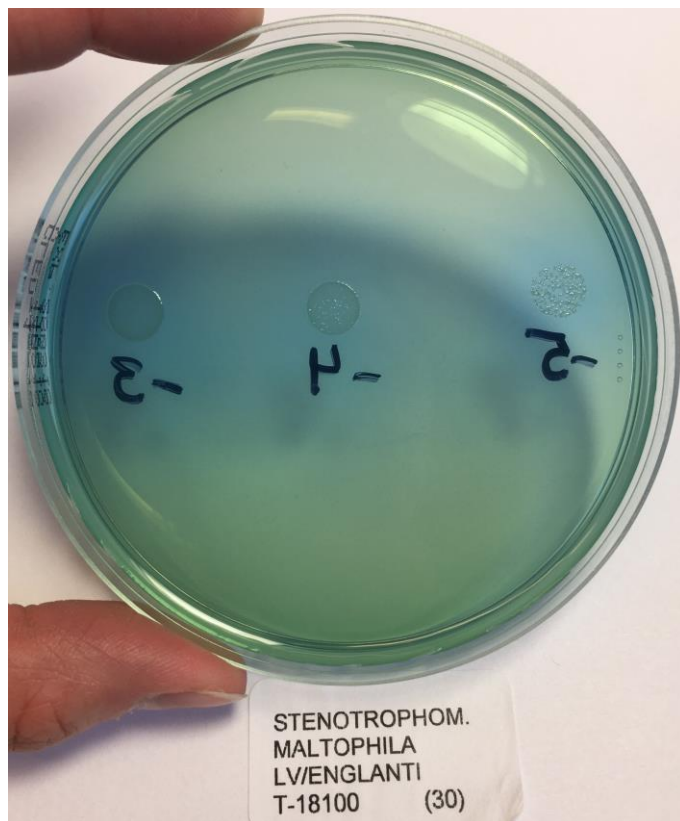
Scarba toimintakontrolli (estää *E.colin* kasvun)



Scarba kontrollimaljana CLED-malja (*E.coli* kasvaa)



Scarba toimintakontrolli, laimennossarja



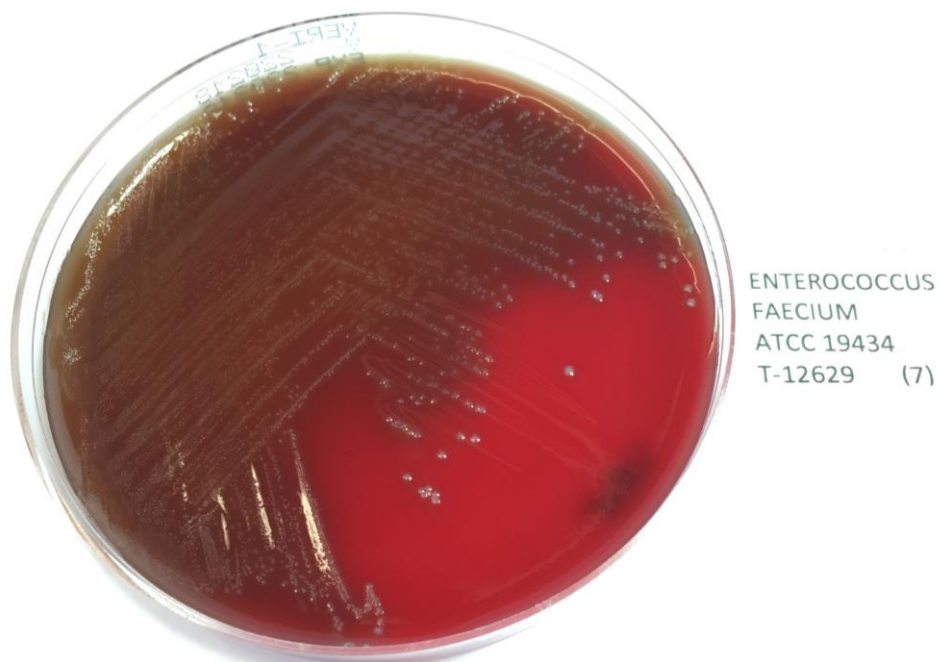
SCarba kontrollimaljana Cled-malja, laimennossarja



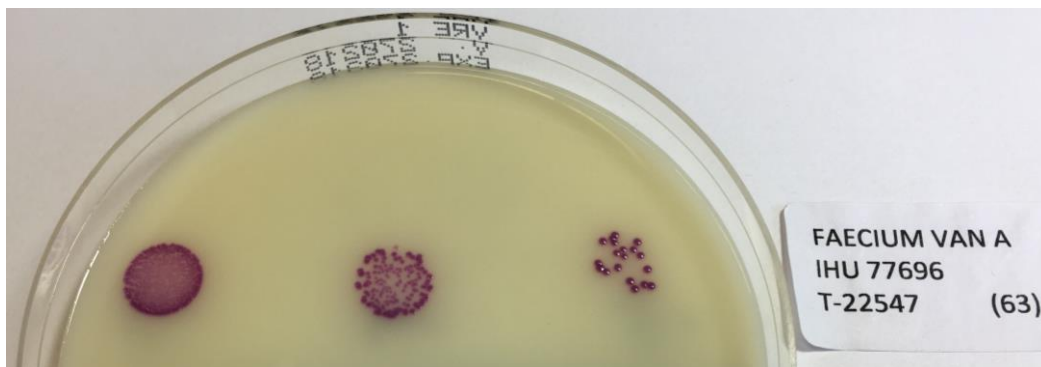
SAM-maljan toimintakontrolli (*S. aureus* ja *S. epidermidis* kasvaa) Ei kontrolli-maljaa



VRE-toimintakontrolli (estää *Enterococcus faecium* kasvun)



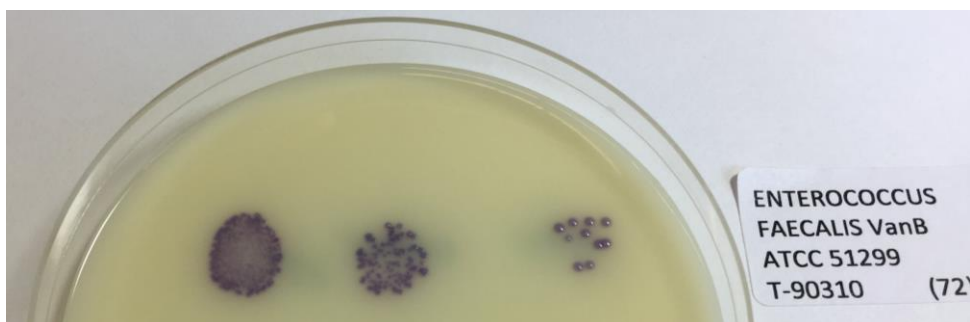
VRE-kontrollimaljana verimalja (*E. faecium* kasvaa)



VRE-toimintakontrolli, laimennossarja, *E. faecium* Van A



VRE-kontrollimaljana verimalja, laimennossarja, *E. faecium* Van A



VRE-toimintakontrolli, laimennossarja, *Enterococcus faecalis* Van B



VRE-kontrollimaljana verimalja, laimennossarja, *E. faecalis* Van B



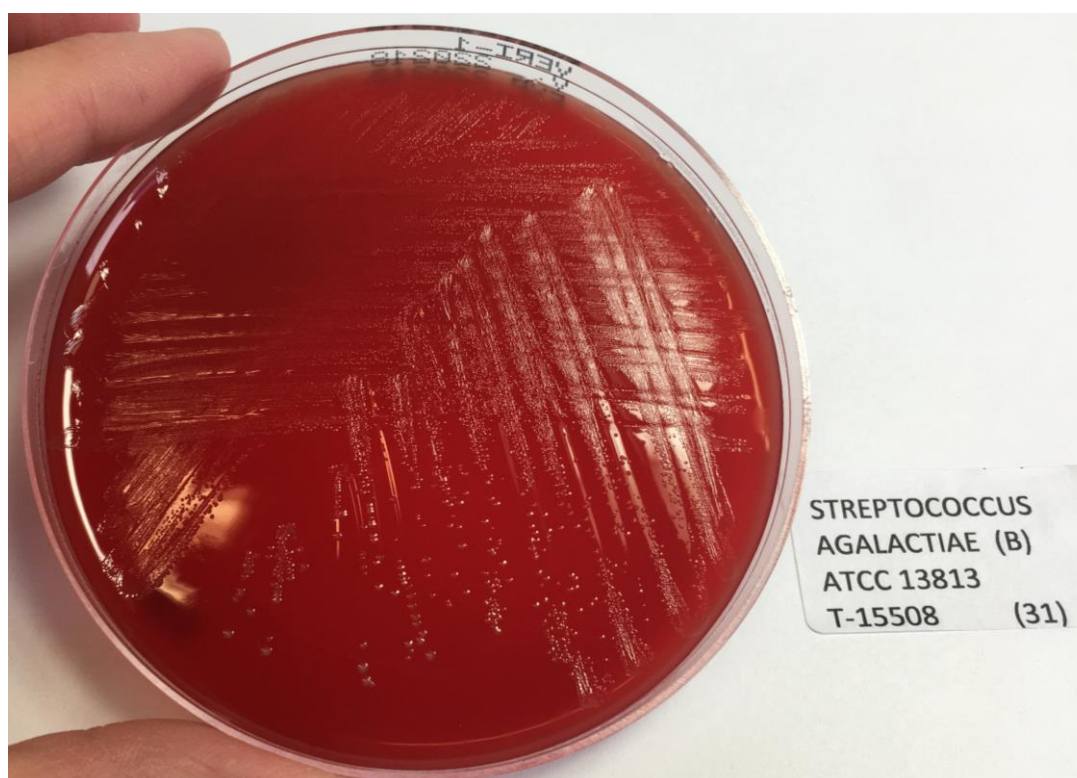
CO-toimintakontrolli (estää *E.coli* ja *S. aureus* kasvun)



CO-kontrollimaljana verimalja (*E.coli* ja *S. aureus* kasvaa)



CO-toimintakontrolli (*Streptococcus agalactiae* kasvaa)



CO-kontrollimaljana verimalja (*Str. agalactiae* kasvaa)



CO-toimintakontrolli, laimennossarja



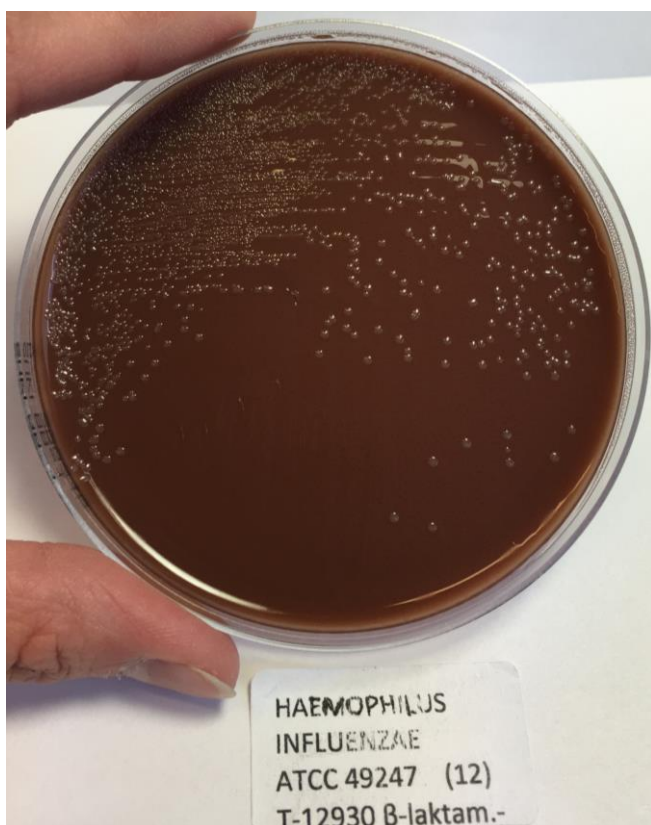
CO-kontrollimaljana verimalja, laimennossarja



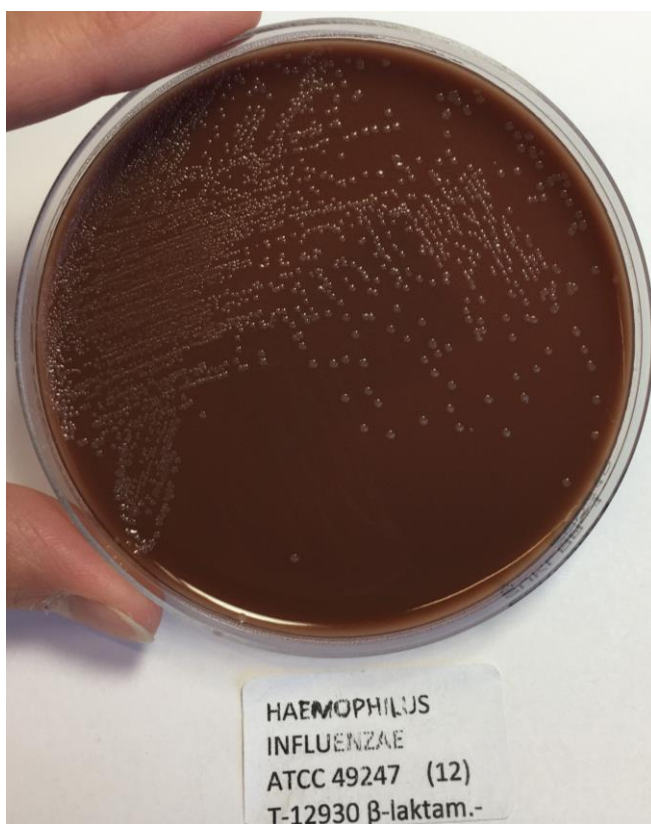
FAA-toimintakontrolli (*Clostridium perfringens* ja *Fusobacterium nucleatum* kasvaa)



FAA-kontrollimaljana FAA-malja (*Clostridium perfringens* ja *Fusobacterium nucleatum* kasvaa)



Suklaa toimintakontrolli (*Haemophilus influenzae* kasvaa)



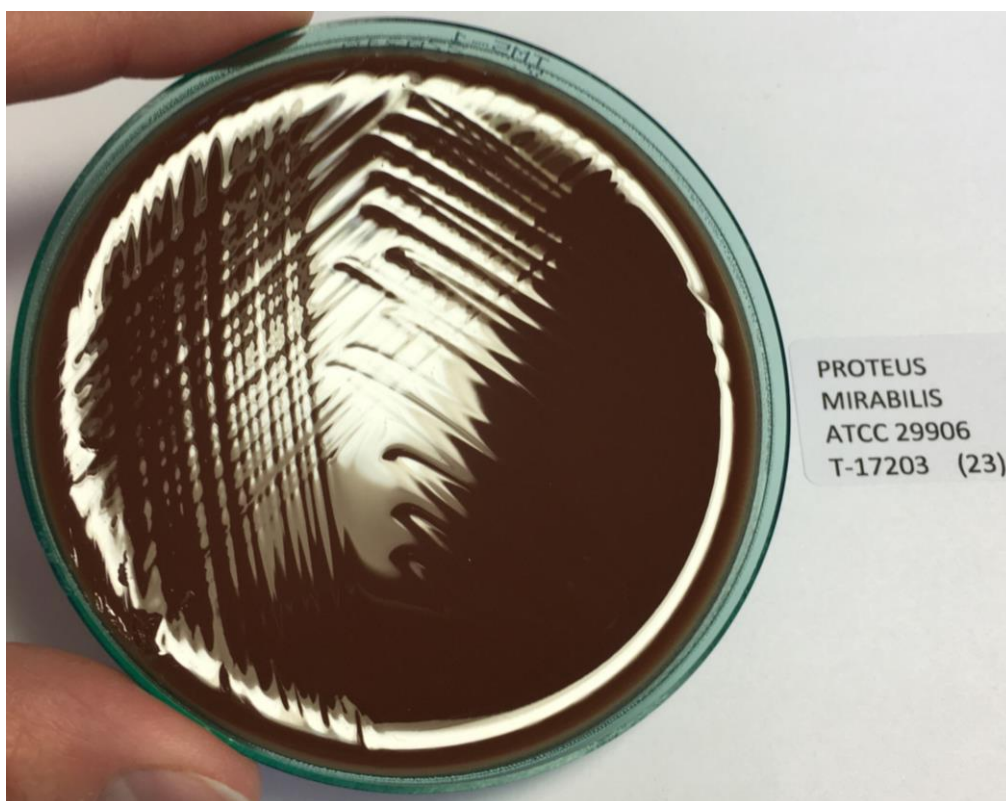
Suklaa kontrollimaljana suklaamalja (*Haemophilus influenzae* kasvaa)



TM5-toimintakontrolli (estää *E.coli*, *Candida albicans* ja *S. epidermidis* kasvun)



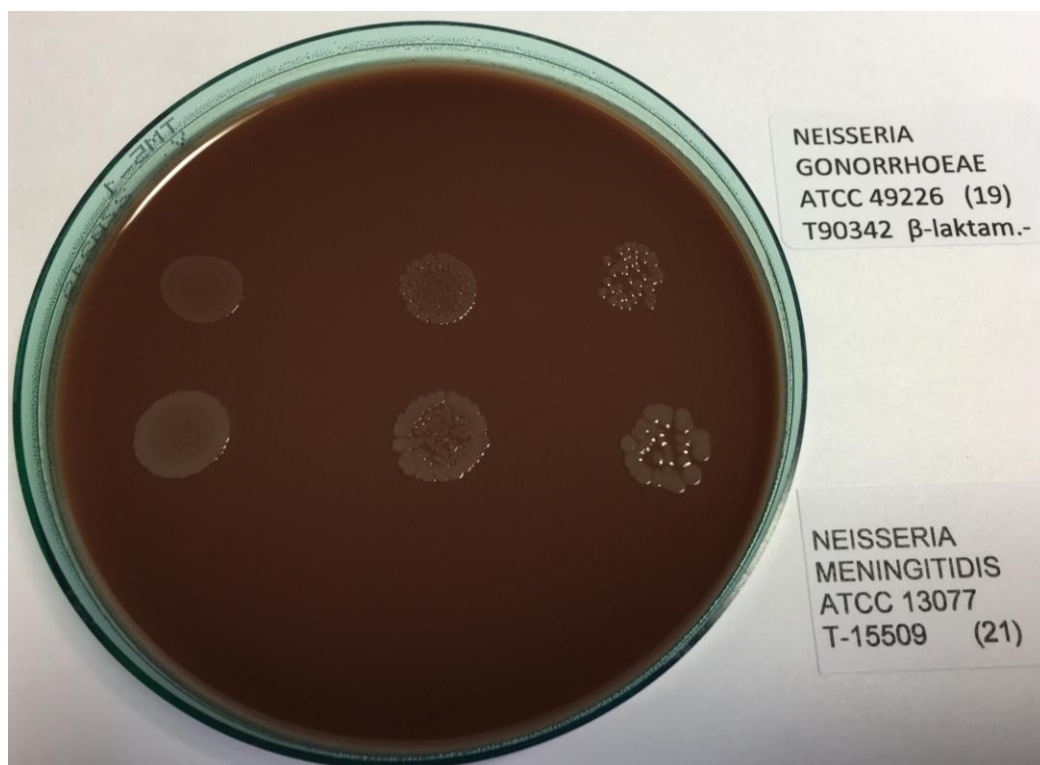
TM5-kontrollimaljana TM1-malja (*E.coli*, *Candida albicans* ja *S. epidermidis* kasvaa)



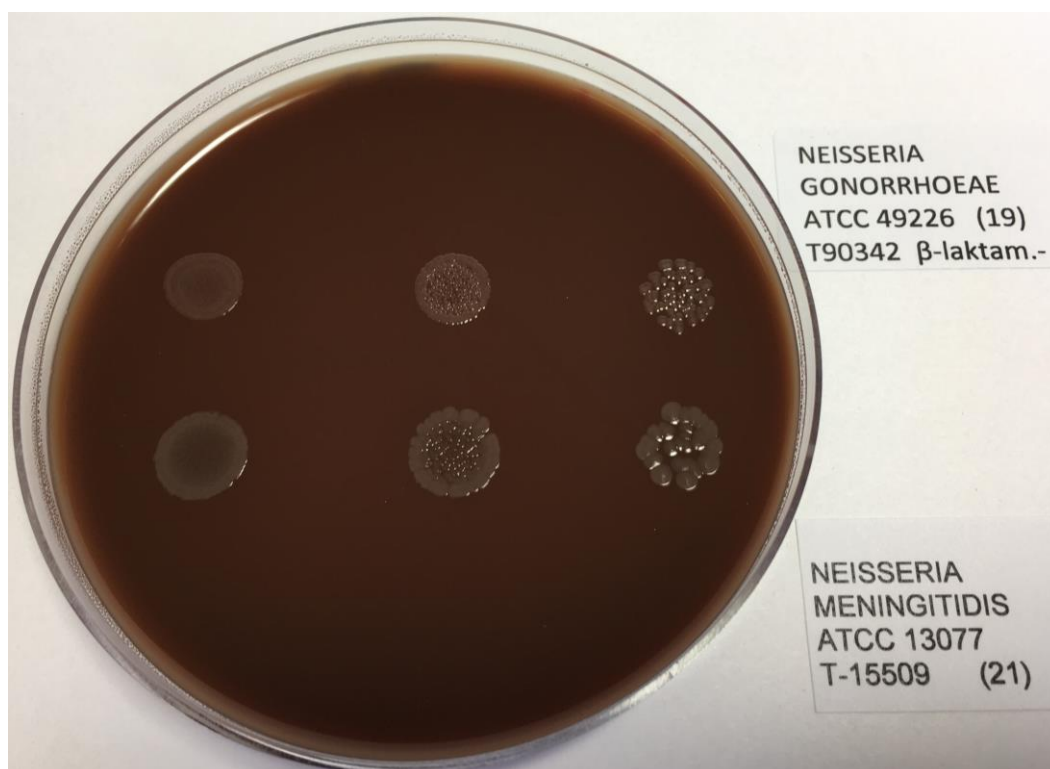
TM5-toimintakontrolli (estää *Proteus mirabilis* kasvua)



TM5-kontrollimaljana TM1-malja (*Proteus mirabilis* kasvaa)



TM5-toimintakontrolli, laimennussarja



TM5-konrollimaljana TM1-malja (kasvun samanlaista kuin TM5 maljassa)



Veri-toimintakontrolli (*Str. pneumoniae* kasvaa)



Veri-konrtollimaljana verimalja (*Str. pneumoniae* kasvaa samalaisena)



Veri-toimintakontrolli (*Str. pyogenes* ja *Str. agalactiae* kasvaa)



Veri-kontrollimaljana verimalja (*Str. pyogenes* ja *Str. agalactiae* kasvaa samantyyppisenä)



PROTEUS
MIRABILIS
ATCC 29906
T-17203 (23)

NV-toimintakontrolli (*Proteus mirabilis* ei kasva (saattaa kasvaa hieman läpi, kuten Kuviossa))

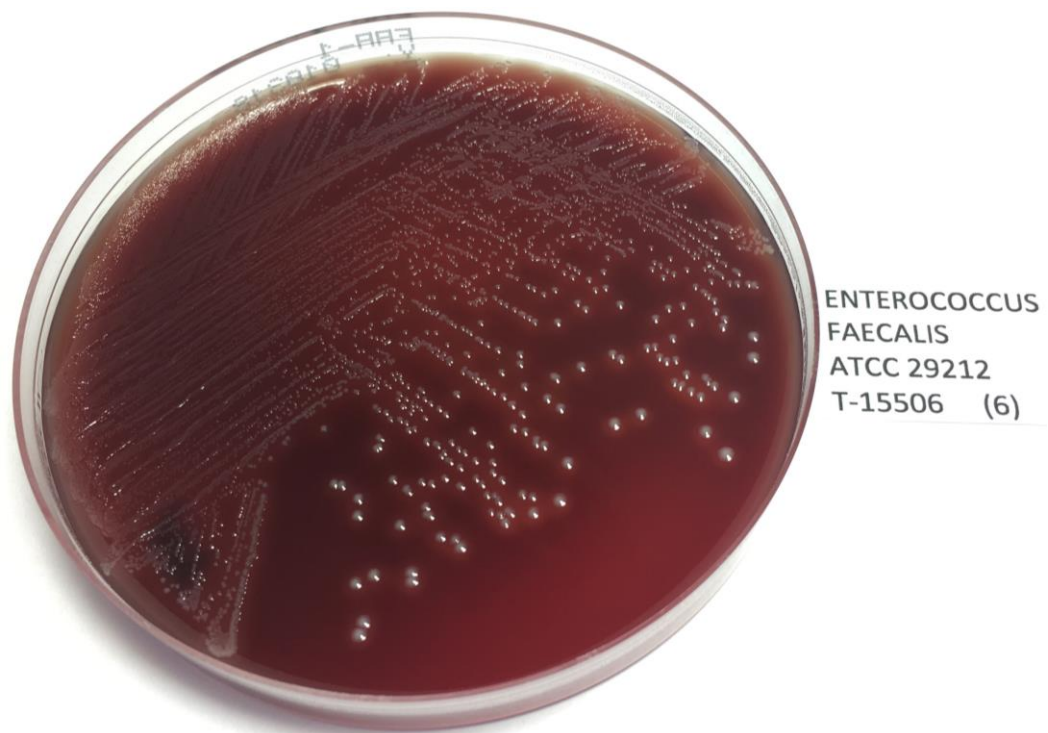


PROTEUS
MIRABILIS
ATCC 29906
T-17203 (23)

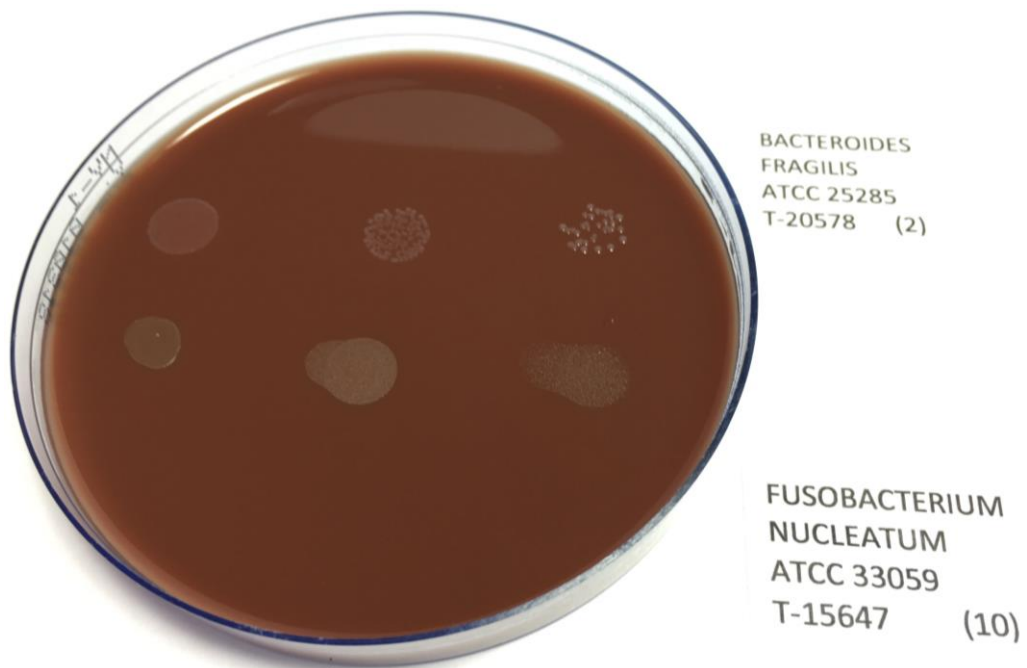
NV-kontrollimaljana FAA-malja (*Proteus mirabilis* kasvaa)



NV-toimintakontrolli (*E. faecalis* ei kasva)



NV-kontrollimaljana FAA-malja (*E. faecalis* kasvaa)



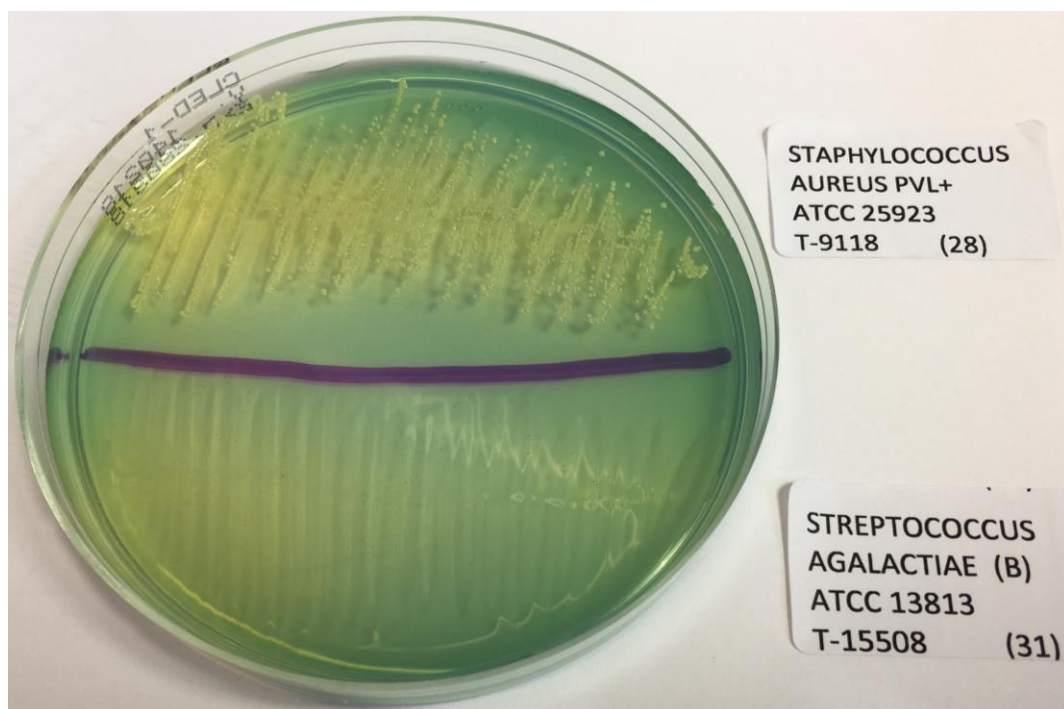
NV-toimintakontrolli, laimennussarja



NV-kontrollimaljana FAA-malja, laimennussarja, kasvaa samalla tavalla kuin toimintakontrollissa



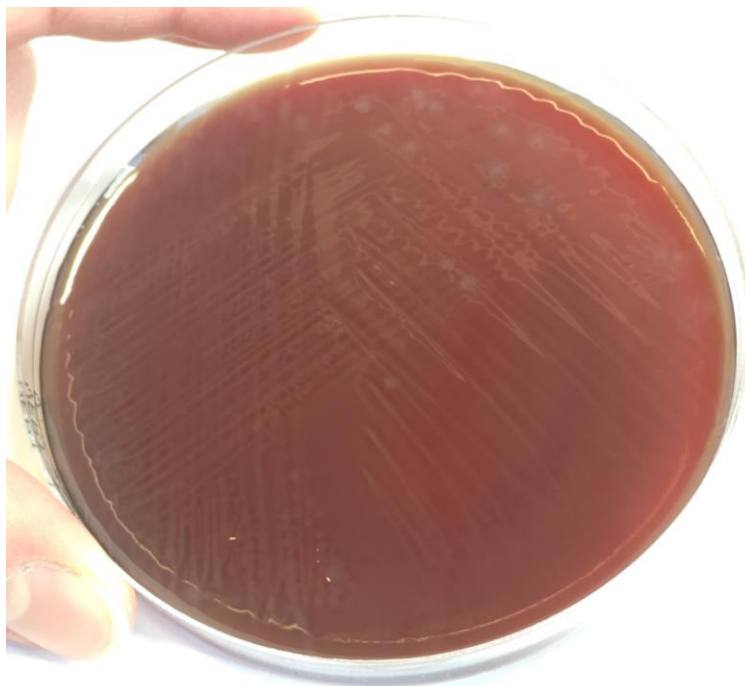
Cled-toimintakontrolli (*E.coli* kasvaa ja on laktoosi positiivinen, *Proteus mirabilis* kasvaa muttei "huntua")



Cled-toimintakontrolli (*S. aureus* ja *Str. agalactiae* kasvaa)

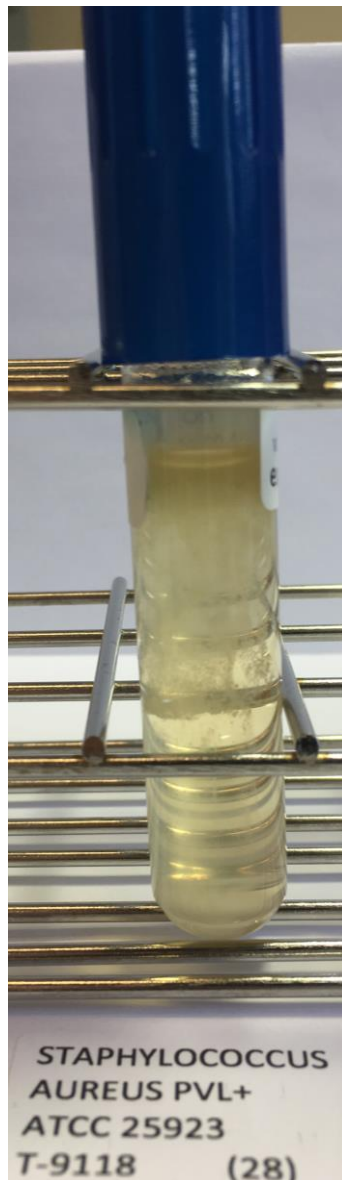


Cled-kontrollimaljana verimalja (*E.coli*, *S.aureus* ja *Str.agalactiae* kasvaa)

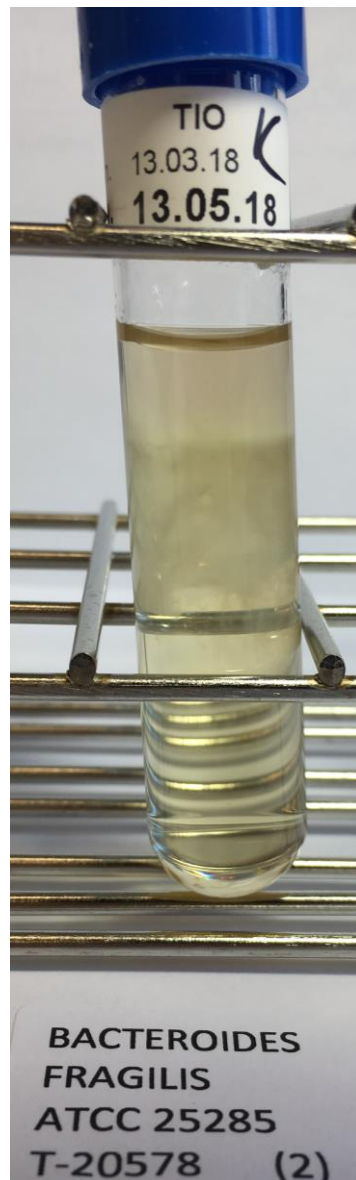


PROTEUS
MIRABILIS
ATCC 29906
T-17203 (23)

Cled-kontrollimaljana verimalja (*Proteus mirabilis* kasvaa "huntuamalla")



Tio-toimintakontrolli
(*S.aureus* kasvaa)



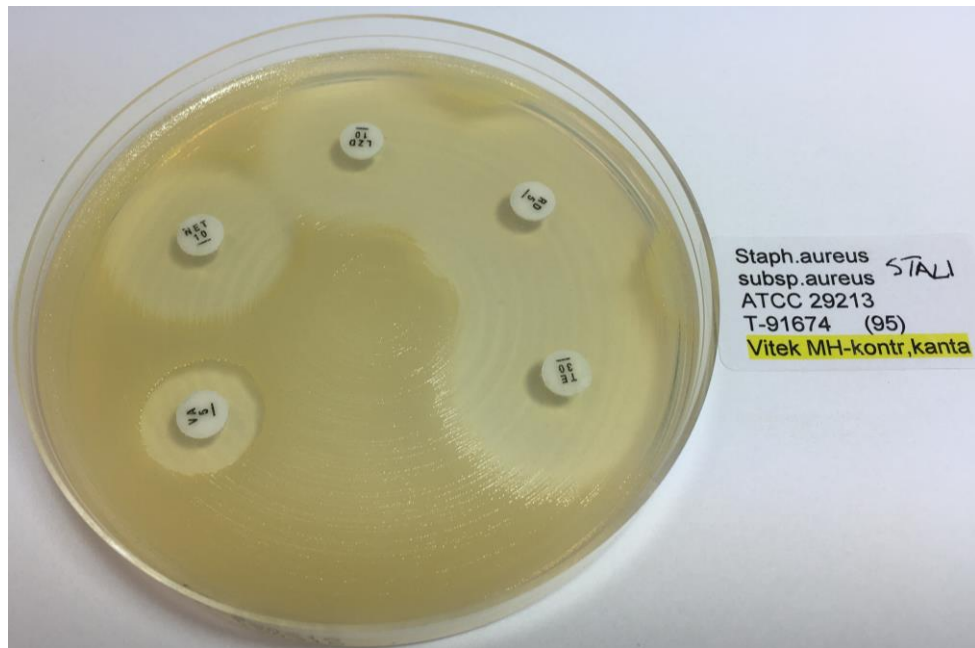
Tio-toimintakontrolli
(*Bacteroides fragilis* kasvaa)



Tio-toimintakontrolli (*S. aureus* kasvaa)



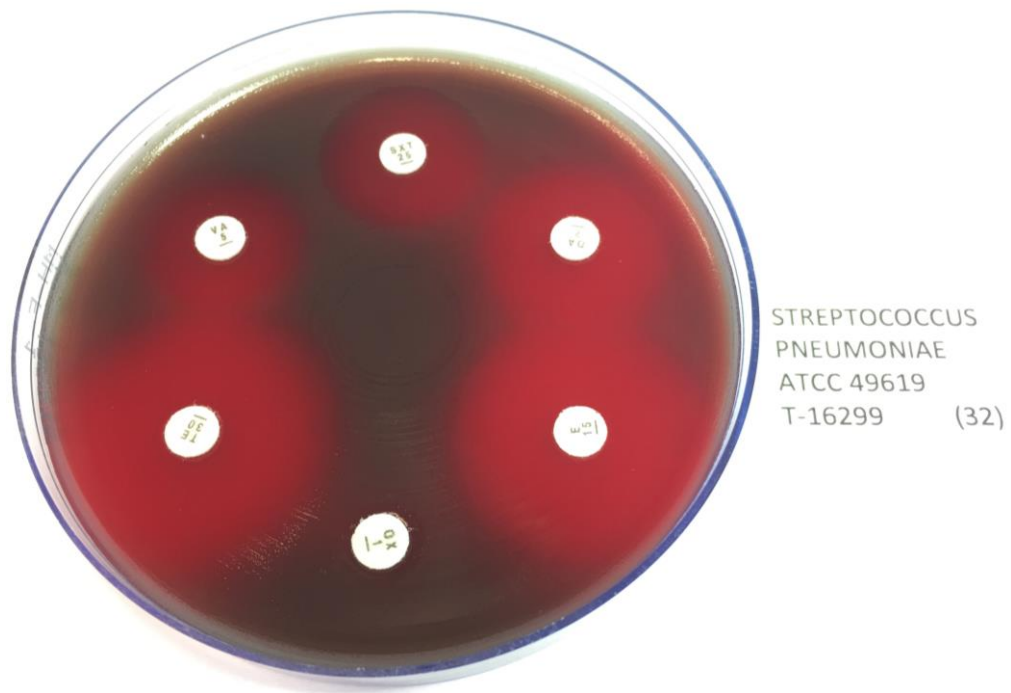
Tio-toimintakontrolli (*Bacteroides fragilis* kasvaa)



MH-toimintakontrolli



MH-toimintakontrolli



MH-F-toimintakontrolli